



# Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Agraria

Dottorato di ricerca in Scienze Agrarie

Curriculum

*Monitoraggio e controllo degli ecosistemi agrari e forestali  
in ambiente mediterraneo*

XXX CICLO

---

**Studi sulla diversità della comunità batterica associata alla  
simbiosi ectomicorrizica tra *Tuber borchii* e *Quercus ilex* in  
differenti ecosistemi forestali della Sardegna**

*Relatore:*

**Prof. Antonio Franceschini**

*Correlatore:*

**Ph.D. Enrico Lancellotti**

**Ph.D. Raffaele Marongiu**

*Dottorando:*

**Dr. Giovanni Ragaglia**

ANNO ACCADEMICO 2016/2017



# Università degli Studi di Sassari

## Dipartimento di Agraria

### Corso di Dottorato in Scienze Agrarie

#### Curriculum

#### *Monitoraggio e controllo degli ecosistemi agrari e forestali in ambiente mediterraneo*

#### XXX CICLO



---

### **Studi sulla diversità della comunità batterica associata alla simbiosi ectomicorrizica tra *Tuber borchii* e *Quercus ilex* in differenti ecosistemi forestali della Sardegna**

dr. Giovanni Ragaglia

*Coordinatore del Corso*

Prof. Antonello Cannas

*Referente di Curriculum*

Prof. Alberto Satta

*Docente Guida*

Prof. Antonio Franceschini

ANNO ACCADEMICO 2016/2017



# Università degli Studi di Sassari

## Dipartimento di Agraria

### Corso di Dottorato in Scienze Agrarie

#### Curriculum

#### *Monitoraggio e controllo degli ecosistemi agrari e forestali in ambiente mediterraneo*

#### XXX CICLO



---

Questa tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Scienze Agrarie dell'Università degli Studi di Sassari, anno accademico 2016/2017 - XXX ciclo, con il sostegno di una borsa di studio cofinanziata con le risorse del **P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013** - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1 *"Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali"*.

La ricerca è stata possibile anche grazie al contributo della Fondazione di Sardegna.

*“Non so come il mondo potrà giudicarmi  
ma a me sembra soltanto di essere un bambino che gioca sulla spiaggia, e di essermi  
divertito a trovare ogni tanto un sasso o una conchiglia più bella del solito,  
mentre l’oceano della verità giaceva inesplorato davanti a me.”*

*(Sir Isaac Newton)*

## **RINGRAZIAMENTI**

Nel presentare il mio lavoro, colgo l'occasione per ringraziare Prof. Antonio Franceschini, Prof. Pietrino Deiana, Ph.D. Raffaele Marongiu Ph.D. Enrico Lancellotti per il prezioso contributo scientifico e di supporto durante tutto il periodo di ricerca e la preparazione di questo lavoro.

Inoltre vorrei ringraziare la ricercatrice dell'”Ecogenomics of interactions team” - 1136 IAM, Ph.D. Aurélie Deveau, e tutto il gruppo di ricerca dipartimento UMR INRA-Lorraine University 1136 “Interactions Arbres-Microorganismes” di Nancy (Francia) per avermi ospitato durante il periodo di stage all'estero, per i preziosi consigli e il supporto nelle attività di identificazione degli isolati batterici.

In fine ringrazio la Prof.ssa Paola Castaldi, la dr.ssa Stefania Diquattro e il dr. Michele Fois per il fattivo contributo nella caratterizzazione chimico-fisica dei suoli tartufigeni analizzati.

## INDICE GENERALE

|  |    |
|--|----|
| RIASSUNTO .....  | 1  |
| ABSTRACT.....  | 2  |
| 1. INTRODUZIONE.....   | 3  |
| 1.1. I MICRORGANISMI NEL SUOLO .....                                   | 4  |
| 1.2. LE SIMBIOSI BATTERICHE CON LE PIANTE SUPERIORI .....              | 7  |
| 1.3. LE SIMBIOSI MICORRIZICHE .....                                    | 9  |
| 1.3.1 IL RUOLO DEI BATTERI NELLA SIMBIOSI ECTOMICORRIZICA.....         | 13 |
| 1.4. IL <i>TUBER BORCHII</i> : VALENZA ECOLOGICA ED ECONOMICA.....     | 16 |
| 1.4.1 I BATTERI ASSOCIATI AL TARTUFO BIANCHETTO.....                   | 18 |
| 2. OBIETTIVI DELLA RICERCA .....                                       | 19 |
| 3. MATERIALI E METODI .....  | 21 |
| 3.1. AREA DI STUDIO.....   | 22 |
| 3.1.1. INQUADRAMENTO CLIMATICO .....                                   | 24 |
| 3.1.2. INQUADRAMENTO GEO-PEDOLOGICO .....                              | 25 |
| 3.1.3. INQUADRAMENTO VEGETAZIONALE .....                               | 25 |
| 3.2. MODALITÀ DI PRELIEVO E PREPARAZIONE DELLE ANALISI.....            | 27 |
| 3.2.1. ESTRAZIONE ED ISOLAMENTO DI BATTERI .....                       | 28 |
| 3.3. ANALISI CHIMICHE DEI CAMPIONI DI SUOLO .....                      | 30 |
| 3.3.1. pH E CONDUTTIVITÀ ELETTRICA .....                               | 30 |
| 3.3.2. TESSITURA DEL SUOLO .....                                       | 31 |
| 3.3.3. CONTENUTO E QUALITÀ DELLA SOSTANZA ORGANICA .....               | 32 |
| 3.3.4. CONTENUTO IN FOSFORO, POTASSIO, FERRO, CARBONIO E AZOTO .....   | 33 |
| 3.3.6. CALCARE ATTIVO E CALCARE TOTALE.....                            | 34 |
| 3.3.7. CAPACITÀ DI SCAMBIO CATIONICO .....                             | 34 |
| 3.4. ANALISI DELL'IMPRONTA METABOLICA DELLE COMUNITÀ MICROBICHE .....  | 36 |
| 3.4.1. PROTOCOLLO DI INOCULO E INCUBAZIONE DI PIASTRE ECOPLATES™ ..... | 37 |
| 3.5. IDENTIFICAZIONE GENETICA DEI BATTERI DEL SUOLO .....              | 39 |

|   |    |
|---|----|
| 3.6. IDENTIFICAZIONE METABOLICA DEI BATTERI DELL' ASCOMA .....                | 40 |
| 3.6.1. PROTOCOLLO DI INOCULO E INCUBAZIONE DI PIASTRE GEN III® .....          | 41 |
| 3.6.2. PROFILO METABOLICO MEDIO DEGLI ISOLATI BATTERICI.....                  | 41 |
| 3.7. ANALISI STATISTICA DEI DATI .....  | 41 |
| 4. RISULTATI E DISCUSSIONE .....  | 42 |
| 4.1. ANALISI CHIMICHE DEI CAMPIONI DI SUOLO .....                             | 42 |
| 4.2. CARICA MICROBICA DELLE DIVERSE COMUNITÀ.....                             | 47 |
| 4.3. ANALISI CLPP DELLA COMUNITÀ MICROBICA DEL SUOLO .....                    | 48 |
| 4.4. IDENTIFICAZIONE GENETICA DEI BATTERI DEL SUOLO .....                     | 51 |
| 4.5. IDENTIFICAZIONE METABOLICA DEI BATTERI LEGATI AL <i>T. BORCHII</i> ..... | 55 |
| 4.5.1. ANALISI METABOLICA DEI PROFILI MEDI .....                              | 57 |
| 4.5.2 DESCRIZIONE DELLE SPECIE IDENTIFICATE .....                             | 58 |
| 5. CONCLUSIONI.....   | 62 |
| 6. BIBLIOGRAFIA.....  | 66 |

## INDICE DELLE FIGURE

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Rapporti quantitativi tra gruppi batterici nel suolo (da: Barbieri <i>et al.</i> , 2008) .. | 5  |
| Figura 2: Aspetto della vegetazione nell'area d'indagine SAG in loc. "San Santino" ...                | 23 |
| Figura 3: Aspetto della vegetazione nell'area d'indagine LFS in loc. "Santa Sofia". ....              | 23 |
| Figura 4: Grafico termo-pluviometrico delle aree di indagine.....                                     | 24 |
| Figura 5: Fonti di carbonio presenti in micropiastra Biolog® Ecoplates™ .....                         | 36 |
| Figura 6: Fonti di carbonio presenti in micropiastra Biolog® Gen III™ .....                           | 40 |
| Figura 7: Analisi granulometrica dei suoli tartufigeni .....  | 42 |
| Figura 8: Dotazione di macronutrienti .....   | 43 |
| Figura 9: Dotazione in ferro .....  | 43 |
| Figura 10: Dotazione in calcare attivo e calcare totale .....   | 44 |
| Figura 11: Valori di conducibilità elettrica .....  | 44 |
| Figura 12: Capacità di scambio cationico (CSC).....   | 45 |
| Figura 13: Quantità in humus e delle sue frazioni fulviche e umiche.....                              | 45 |
| Figura 14: Rapporto carbonio/azoto.....   | 46 |
| Figura 15: Valori delle conte microbiche totali .....   | 47 |
| Figura 16: Grafico dell'attività metabolica complessiva (AWCD).....                                   | 48 |
| Figura 17: Biodiversità microbica - indice di Shannon .....   | 48 |
| Figura 18: Biodiversità microbica - Richness .....  | 49 |
| Figura 19: Utilizzo di fonti di carbonio – 72 h di incubazione .....                                  | 49 |
| Figura 20: Utilizzo di fonti di carbonio – 120 h di incubazione .....                                 | 50 |
| Figura 21: Famiglie batteriche rilevate in <i>Calcareous Soil Bulk</i> (CSB).....                     | 51 |
| Figura 22: Famiglie batteriche rilevate in <i>Granitic Soil Bulk</i> (GSB).....                       | 52 |
| Figura 23: Famiglie batteriche rilevate in <i>Calcareous Soil Ascocarp</i> (CSA).....                 | 53 |
| Figura 24: Famiglie batteriche rilevate in <i>Granitic Soil Ascocarp</i> (GSA).....                   | 53 |
| Figura 25: Confronto delle comunità microbiche delle diverse tipologie di suolo .....                 | 54 |
| Figura 26: Grafico di confronto tra le comunità microbiche dei diversi ascomi .....                   | 55 |
| Figura 27: Analisi dei cluster dei profili metabolici delle specie identificate.....                  | 56 |



|  |    |
|--|----|
| Figura 28: Analisi dei cluster dei profili metabolici medi degli isolati batterici ..... | 57 |
| Figura 29: Metabolismo delle diverse fonti di carbonio riferito ai profili medi .....    | 58 |

## INDICE DELLE TABELLE

|  |    |
|--|----|
| Tabella 1: Carica microbica media nel suolo (da: Barbieri <i>et al.</i> , 2008). ..... | 4  |
| Tabella 2: Estensione e tipologia dei boschi in Sardegna (Gasparini, 2011).....        | 20 |
| Tabella 3: Ubicazione delle due aree di indagine in Sardegna. ....                     | 22 |
| Tabella 4: Provenienza e numero degli isolati batterici ottenuti.....                  | 29 |
| Tabella 5: Valori delle conte microbiche totali.....                                   | 47 |
| Tabella 6: Batteri identificati metabolicamente con tecnologia Biolog GEN III® .....   | 56 |

## RIASSUNTO

È stata rilevata la componente batterica del suolo e quella infeudata in ascomi di *Tuber borchii* campionati in due leccete sviluppatesi su suoli a diversa matrice rocciosa, al fine di valutarne le eventuali differenze quanti-qualitative tra i siti di campionamento.

Le analisi chimiche effettuate sui campioni di suolo hanno messo in evidenza le loro principali caratteristiche fisico-chimiche. Le comunità microbiche estratte dai diversi campioni di suolo sono state valutate sia tassonomicamente, tramite sequenziamento del rRNA della regione 16S ribosomiale di 184 isolati batterici, sia su base funzionale con l'uso di piastre metaboliche Ecoplates Biolog<sup>®</sup>. Le comunità microbiche legate al micro-habitat ascomico sono state valutate con metodica GEN III Biolog<sup>®</sup>, su 36 isolati.

Lo studio ha messo in evidenza come le due comunità microbiche terricole dei due siti, pur differenziandosi dal punto di vista tassonomico, sono identiche dal punto di vista funzionale e metabolico.

Inoltre si osservano differenze di composizione delle comunità batteriche: tra i corpi fruttiferi campionati dai due siti, tra corpo fruttifero e suolo ascomico nonché tra corpo fruttifero e suolo forestale, avvalorando quindi l'ipotesi che ogni micro-ambiente rilevato in questo studio è una nicchia ecologica che seleziona specifiche comunità batteriche.

Tra i batteri rilevati nei vari ascomi sono stati rilevati PGPR, saprofiti, patogeni dei funghi e patogeni umani.

## ABSTRACT

The bacterial component of the soil and of the ascocarps of the *Tuber borchii* sampled in two holm oaks grown on soils with different rock matrix was detected, in order to evaluate any quantitative-qualitative differences between the sampling sites.

The chemical analysis carried out on soils samples have highlighted their main physics and chemical characteristics.

The microbial communities extracted from the different soil samples were assessed both taxonomically, by sequencing the rRNA of the ribosomal 16S region of 184 bacterial isolates, and on a functional basis with the use of Ecoplates Biolog®. The microbial communities related to the ascocarp micro-habitat were evaluated with GEN III Biolog® system (36 isolates.)

The study has shown how the two microbial communities of the soil of the two sites, even if they are different by taxonomic composition, are identical from a metabolic-functional point of view.

In addition, differences in the composition of bacterial communities are observed: among the fruiting bodies sampled by the two sites, between ascocarp and ascocarpic soil and between ascocarp and forest soil, thus corroborating the hypothesis that every micro-environment detected in this study is an ecological niche that selects specific bacterial communities.

PGPR, saprophytes, fungi and human pathogens were detected among the bacteria detected in the various ascocarps.

## 1. INTRODUZIONE

Nell'accezione più comune, i termini “bosco”, “foresta” o “selva” indicano un'ampia superficie di terreno coperto da alberi, solitamente ad alto fusto, in cui spesso viene compreso lo strato arbustivo e quello erbaceo in esso racchiuso.

Il mero inquadramento del concetto di bosco all'interno di misurazioni di estensione e copertura arborea risulta estremamente riduttivo se si pensa alle varie funzioni alle quali esso naturalmente ottempera, poiché non può essere sottovalutato il ruolo svolto dall'ecosistema foresta in termini di conservazione della biodiversità e della variabilità genetica (Giannini, 2006). Esso infatti va ben oltre la somma dei singoli alberi delle provvigioni di legname retraibili o dei chilometri di sentieri turistici presenti (Ciancio, 2012). Ecologicamente rappresenta un habitat assai diversificato in cui gli alberi svolgono la loro parte quanto gli arbusti, le erbe, la macro- meso- e micro-fauna, i funghi, i licheni ecc. Tutti questi elementi mostrano tra loro delle profonde interazioni che le moderne discipline biologiche studiano per far sì che il bosco continui a svolgere le proprie funzioni in modo ottimale (Ciancio e Nocentini, 2009).

Tra queste interconnessioni di tipo trofico-funzionale, rivestono particolare importanza le relazioni tra gli alberi (arbusti compresi) e i microrganismi che vivono nel suolo.

Questi ultimi si pongono in posizione intermedia nella catena trofica che unisce il suolo agli organismi vegetali superiori e svolgono ecologicamente la funzione di mineralizzare la sostanza organica, rendendola disponibile alle piante e instaurando rapporti trofici di varia natura che vanno dal saprofitismo alla simbiosi commensalistica o mutualistica, sino al patosismo.

## 1.1. I MICRORGANISMI NEL SUOLO

Le comunità microbiche del suolo sono composte da batteri, funghi, alghe e protozoi. Le conte microbiche, generalmente comprese tra  $4 \times 10^6$  e  $2 \times 10^9$  ufc/g (peso secco) di suolo (Whitman *et al.*, 1998), possono raggiungere valori dell'ordine di  $10^{10}$  ufc/g, con una diversità specifica compresa tra  $4 \times 10^3$  (Torsvik *et al.*, 1990). e  $5 \times 10^4$  (Roesch *et al.*, 2007), incluse le specie recalcitranti alla coltivazione. La loro distribuzione è determinata dalla presenza di sostanze nutritive e caratterizzata dalla formazione di un biofilm, che ne permette l'adesione alle superfici (Costerton, 2005). La maggiore presenza microbica si ritrova negli orizzonti più superficiali ricchi di sostanza organica, specialmente nella zona adiacente alle radici delle piante (rizosfera).

Nel suolo l'insieme dei **batteri** è quello numericamente più consistente (Tab. 1). Essi svolgono un ruolo determinante nei cicli biogeochimici rendendo disponibili le sostanze nutritive complessate all'interno delle rocce e della sostanza organica (Davison, 1988): per queste ragioni sono fondamentali per la salute delle piante e per la fertilità del suolo. La loro capacità di sintetizzare particolari composti biochimici facilita l'assunzione da parte delle piante di determinate sostanze nutritive dal suolo, e ritarda o impedisce il diffondersi di fitopatie (Brierley, 1985; Ehrlich, 1990). Più di recente, alcune specie batteriche si sono rivelate molto utili nel recupero di terreni inquinati grazie alla loro capacità di mineralizzare alcuni composti organici inquinanti (Middledrop *et al.*, 1990; Burd *et al.*, 2000; Zhuang *et al.*, 2007; Zaidi *et al.*, 2008).

Tabella 1: Carica microbica media nel suolo (da: Barbieri *et al.*, 2008).

| Microrganismi  | Suolo Rizosferico<br>(ufc/g di suolo) | Suolo non rizosferico<br>(ufc/g di suolo) |
|----------------|---------------------------------------|---|
| Batteri        | $1,2 \times 10^9$                     | $5 \times 10^7$                           |
| Funghi         | $1,2 \times 10^6$                     | $1 \times 10^5$                           |
| Protozoi       | $2,4 \times 10^3$                     | $1 \times 10^3$                           |
| Ammonificanti  | $5 \times 10^8$                       | $4 \times 10^6$                           |
| Denitrificanti | $1,3 \times 10^8$                     | $1 \times 10^5$                           |

Nelle comunità batteriche del suolo si possono distinguere due tipologie di popolazioni (Boyce, 1984):

**autoctone:** caratterizzate da una lenta crescita ed una strategia di sviluppo di tipo “k”, con un utilizzo ottimale dei substrati disponibili e una maggiore conservazione delle risorse ambientali;

**zimogene:** contraddistinte da un rapido sviluppo ed una strategia di tipo “r”, mostrando una crescita attiva solo quando sono disponibili (ed in grande quantità) dei substrati nutrienti idonei.

Gli studi sul rapporto quantitativo dei diversi gruppi batterici nel suolo vedono *Proteobatteri* quale gruppo più numeroso (48%), seguiti dai *Firmicutes* (20%) e dagli *Attinomiceti* (18%) (Janssen, 2006; Barbieri *et al.*, 2008) (Fig. 1). Va comunque tenuto in debita considerazione che le tecniche attualmente a disposizione riescono a coltivare appena lo 0,1-1% dei batteri effettivamente esistenti in natura (Torsvik, 1978; 1996).

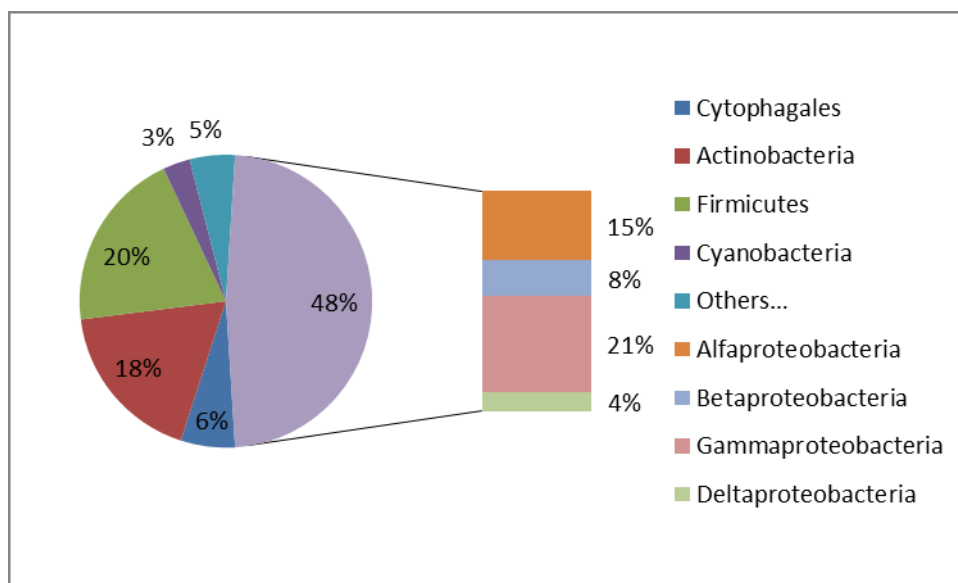


Figura 1: Rapporti quantitativi tra gruppi batterici nel suolo (da: Barbieri *et al.*, 2008)

Tra i **funghi**, i generi maggiormente rappresentati sono *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Trichoderma*. La loro importanza ecologica spazia dalla degradazione della sostanza organica (viva e morta), al miglioramento dell'aerazione e del bilancio idrico del suolo, sino alla creazione di relazioni con diverse specie vegetali.

Le **alghe** (compresi cianobatteri e licheni) si trovano solo negli strati più superficiali di suolo e rocce, essendo tra i primi colonizzatori delle superfici prive di vegetazione. Contribuiscono in modo apprezzabile alla disgregazione del materiale roccioso.

I **protozoi**, riscontrabili nei primi 15 cm di suolo, sono alloctoni, solitamente in forma di cisti, ciliati flagellati o rizopodi. Vivono a spese dei batteri e degradano la sostanza organica.

Nel compiere le loro diverse funzioni ecologiche, tutti questi microrganismi instaurano interazioni di vario tipo, sia tra di essi sia con le piante superiori. Una pianta è quindi inserita in un mondo microbico sul quale esercita la sua influenza e dal quale dipende per reazioni laterali e sottoprodotti metabolici (Florenzano, 1983).

## 1.2. LE SIMBIOSI BATTERICHE CON LE PIANTE SUPERIORI

Alcune specie batteriche hanno dimostrato di poter sviluppare interazioni positive - dirette e indirette - con le piante superiori, ed in particolare con il loro apparato radicale (Hayat, 2010). Sulla base di questa caratteristica è stata coniata la definizione di “*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*” (PGPR) (lista completa in Hayat, 2010) per quei batteri che, colonizzando le radici delle piante, ne promuovono in modo diretto o indiretto la crescita (Kloepper e Schroth, 1978; Kloepper *et al.*, 1989; Cleyet-Marcel *et al.*, 2001). Gli stessi, dal punto di vista funzionale, si possono ulteriormente classificare come “*Plant Health Promoting Rhizobacteria*” (PHPR) e “*Nodule Promoting Rhizobacteria*” (NPR) (Burr e Caesar, 1984).

In relazione alla tipologia relazionale instaurata con le piante, i PGPR possono essere suddivisi in Batteri simbionti (iPGPR) i quali colonizzano l'interno delle cellule vegetali, e “*free-living rhizobacteria*” (ePGPR) che, pur vivendo all'esterno delle cellule vegetali, svolgono comunque un ruolo nello sviluppo della pianta (Gray e Smith 2005; Khan, 2005).

Appartengono al gruppo dei PGPR i batteri azotofissatori, non tutti simbionti, come i cianobatteri del genere *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (Lynch, 1983; Bottomley and Maggard, 1990; Bottomley and Dughri, 1989) o i batteri appartenenti alle specie *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* (Burd *et al.*, 2000; Cocking, 2003). Così anche alcune specie appartenenti a *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* che hanno mostrato la capacità di rendere assimilabile il fosforo a partire da substrati rocciosi (Goldstein, 1986; Rodríguez e Fraga, 1999; Rodríguez *et al.*, 2006).

Alcuni batteri - simbionti e non - di diverse specie, appartenenti principalmente ai generi *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces* (Hayat, 2010), svolgono le funzioni tipiche dei PGPR producendo fitormoni (Dangar e Basu, 1987; Lynch 1990; Arshad e Frankenberger, 1991; 1993; Glick 1995; García de Salamone *et al.*, 2001; Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2001; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Dobbelaere *et al.*, 2003; Vivas *et al.*, 2005).

Alcune specie dei generi *Bacillus*, *Deinococcus*, *Methanobacteria*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* etc., sono associabili al gruppo dei PGPR per la loro capacità di bonificare siti



inquinati, degradando composti del carbonio, azoto e fosforo, o metabolizzando metalli tossici, composti aromatici, erbicidi, pesticidi etc. (Narasimhan *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; 2005; Milton, 2007; Zhuang *et al.*, 2007).

Anche la protezione delle piante dai patogeni rientra indirettamente tra le caratteristiche intrinseche del gruppo dei PGPR (Schippers *et al.*, 1987; Dobbelaere *et al.*, 2003; Glick e Pasternak, 2003), riscontrabile ad esempio in alcune specie dei generi *Streptomyces* per la produzione di siderofori (Loper e Buyer, 1991); *Azospirillum*, *Klebsiella* e *Rhizobium* per la degradazione della pectina (Chatterjee *et al.*, 1978; Umali-Garcia *et al.*, 1980; Tien *et al.*, 1981; Angle 1986; Séguin e Lalonde, 1989); *Bacillus* per la sintesi di antibiotici (Brannen e Backman, 1994; Kokalis-Burelle *et al.*, 2006).

### 1.3. LE SIMBIOSI MICORRIZICHE

Un'altra particolare forma di simbiosi mutualistica si identifica nelle **micorrize**: strutture biologiche che si realizzano tra il micelio dei del suolo e gli apici radicali di piante superiori. I primi studi furono condotti in Italia nel 1882 da Giuseppe Gibelli, botanico che descrisse per la prima volta la convivenza di “indigenato tollerabile e tollerato” tra ife fungine e radici di castagno.

Nel 1887 il patologo forestale tedesco Albert Bernhard Frank conia il termine “micorriza”, la cui etimologia deriva dal greco *myco* = fungo e *rhyza* = radice, al fine di definire la particolare associazione tra un fungo e una radice viva di una pianta (Frank, 1887). Questa simbiosi, generatasi oltre 400 milioni di anni fa, ha consentito la conquista della terra da parte delle piante (Selosse e Le Tacon, 1998).

La maggior parte delle piante vascolari e delle briofite sono capaci di determinare questa associazione con diversi *taxa* fungini, in particolare con specie appartenenti agli *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Glomeromycota* e *Zygomycota* (Smith e Read, 2008). Attualmente si conoscono solo cinque famiglie di Angiosperme che si prestano solo in parte alla formazione di micorrize: *Caryophyllaceae* (50%), *Chenopodiaceae* (61%), *Cruciferae* (87%), *Cyperaceae* (74%) e *Juncaceae* (56%).

La tipologia e le caratteristiche del rapporto di simbiosi variano in base agli organismi coinvolti e alle condizioni ambientali, ma di solito si osserva un vantaggio reciproco per entrambi i partner. Fanno eccezione le micorrize delle *Orchidaceae*, poiché durante le fasi aclorofilliche dei primi stadi di vita della pianta mostrano un esclusivo beneficio per quest'ultima.

Si possono distinguere i seguenti tipi di simbiosi micorriziche:

- **Micorrize vescicolo-arbuscolari (VAM):** si tratta di micorrize costituite da strutture ifali dette arbuscoli, molto ramificate e rapidamente senescenti, che si formano all'interno delle cellule corticali radicali delle piante ospiti (Smith e Read, 2008). I funghi delle VAM appartengono alla divisione *Glomeromycota*; sono simbionti obbligati e molto diffusi, spesso associati a diverse specie di interesse forestale appartenenti ai generi *Acer*, *Cupressus*, *Fraxinus*, *Platanus*, *Prunus*, *Sequoia*, *Taxus*, *Ulmus* (Schüßler *et al.*, 2001);

- **Ectomicorrize (EcM):** sono formate da funghi che, contrariamente a quelli implicati nelle VAM, non accrescono la loro colonizzazione all'interno delle cellule ma si limitano agli spazi extracellulari dell'epidermide organizzando un reticolo, conosciuto come *Reticolo di Hartig*, che funge da interfaccia di scambio tra fungo e radice. Esternamente gli apici radicali infettati mostrano evidenti cambiamenti morfologici, con una struttura di rivestimento costituita di ife fungine denominata “*mantello*” o “*micoclina*”. Da questa si dipartono verso l'esterno numerose ife, definite “*trofiche*”, che formano una rete miceliale di collegamento tra apice radicale, suolo e sporomi (Smith e Read, 2008). Ad oggi sono riportate in letteratura 26 famiglie - includenti 145 generi e oltre 6000 specie di piante (5600 Angiosperme e 285 Gimnosperme) - che possono formare simbiosi ectomicorriziche con una grande diversità di specie fungine, stimate in 5000-6000 specie (Brundrett, 2009). Nella maggior parte dei casi si tratta di simbiosi aspecifiche riconducibili alle divisioni degli *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Zigomycota* (Smith e Read, 2008).
- **Ectendomicorrize:** a differenza delle ectomicorrize formano un mantello più sottile o non lo formano affatto, e le ife del Reticolo di Hartig interessano anche il lume delle cellule degli apici infettati. Questa tipologia di simbiosi micorrizica si può osservare nelle Angiosperme e nelle Gimnosperme, associate a diversi funghi delle divisioni degli *Ascomycota* e *Basidiomycota* (Brundrett, 2008).
- **Micorrize arbutoidi:** sono formate da Basidiomiceti e da piante appartenenti all'ordine *Ericales*, in particolare alle famiglie *Ericaceae* e *Pyrolaceae*. In questo caso le ife del Reticolo di Hartig possono penetrare nelle cellule e formare ammassi miceliari che, pur occupando gran parte del volume cellulare, rimangono separati dal citoplasma per via di una membrana plasmatica che funge da interfaccia (Fusconi e Bonfante-Fasolo, 1984).
- **Micorrize monotropoidi:** sono formate da funghi Basidiomiceti e da piante della famiglia *Monotropaceae*, dell'ordine *Ericales*. Sono caratterizzate da un mantello compatto, solitamente multistratificato. In questo caso il Reticolo di Hartig è confinato all'epidermide, da cui origina strutture analoghe ad austori che irrompono nelle cellule dell'ospite (Brundrett, 2008).
- **Micorrize ericoidi:** sono costituite da Ascomiceti e da piante dell'ordine delle *Ericales*. Le ife fungine formano dapprima una rete attorno alla zona delle radici fini

della pianta, poi penetrano e proliferano abbondantemente all'interno delle cellule epidermiche, senza tuttavia entrare in diretto contatto con il citoplasma a causa dell'invaginazione ripetuta della membrana plasmatica della cellula vegetale. Queste strutture rimangono attive per circa 5-6 settimane per poi morire in seguito alla degenerazione del citoplasma della cellula che ospita le ife fungine (Smith e Read, 2008).

- **Micorrize delle Orchidaceae:** sono simbiosi che le piante di questa famiglia instaurano con Basidiomiceti e alcuni Ascomiceti del genere *Tuber* (Dearnaley, 2007). Si tratta di una simbiosi obbligatoria, dovuta all'aclorofillicità delle piante di questa famiglia nelle prime fasi di vita e conservata anche in fase adulta da oltre un centinaio di specie (Leake, 2005). In questa particolare simbiosi il fungo colonizza i tessuti vegetali formando i caratteristici *pelotoni*, ossia gomitoli di ife intracellulari attraverso i quali avvengono gli scambi nutrizionali con l'ospite. Già da diverso tempo vengono studiate, soprattutto a causa della rilevanza economica della pianta ospite.

In ambito forestale le ectomicorrize rivestono particolare importanza sia per la loro diffusione sia per la tipologia delle piante ospiti. Alle nostre latitudini diverse specie di interesse forestale come *Fagus*, *Picea*, *Pinus*, e *Quercus* formano complessi ectomicorrizici con diversi generi fungini quali *Amanita*, *Boletus*, *Cenococcum*, *Russula*, *Tuber*, stabilendo rapporti mutualistici di importanza fondamentale (Montecchio, 2006), spesso determinante per la sopravvivenza di uno o di entrambi i simbionti: da un lato la pianta è favorita nelle attività di reperimento e traslocamento di acqua e di diverse sostanze nutritive, dall'altro la parte fungina può agevolmente trarre dalla pianta carboidrati ed altri preziosi elementi contenuti negli essudati radicali (Brundrett, 2004). Questo avviene grazie allo sviluppo del "micelio extramateriale" che caratterizza le ectomicorrize: si tratta di un micelio costituito da ife trofiche che si propagano nel suolo a partire dal mantello, aumentando di fatto l'area di esplorazione delle radici, la superficie assorbente (per ogni metro di radice, 1000 metri di micelio) e, di conseguenza, l'assunzione di acqua e di soluti da parte delle stesse (Agerer, 1991; Plassard *et al.*, 2000). Queste ife si accrescono singolarmente oppure si aggregano per generare cordoni ifali e rizomorfe; per mezzo di ponti interfali e di anastomosi permettono la traslocazione sino al mantello dell'acqua e delle sostanze nutritive adsorbite, rendendole quindi fruibili per le radici delle piante ospiti (Smith e Read, 2008). Inoltre il complesso di emanazioni ifali - micoclina, protegge l'apice da inquinanti fitotossici presenti nel suolo (Rousseau *et al.*, 1994).

Da un punto di vista strettamente fitopatologico, il complesso ectomicorrizico costituisce una barriera fisica alla penetrazione di eventuali parassiti nell'apice delle radici, modifica qualitativamente e quantitativamente gli essudati radicali emessi nella rizosfera e produce anche dei composti antibiotici i quali sono tossici nei confronti di altri microrganismi del terreno (Smith e Read, 2008; Morte *et al.*, 2010; Perotto *et al.*, 2013). Inoltre il micelio extramaticale permette che uno stesso fungo colleghi con le proprie ife diverse piante, anche di specie diverse, influenzando positivamente la resilienza dell'ecosistema. Difatti la rete miceliale trofica realizzata da una comunità ectomicorrizica migliora la produttività dell'ecosistema durante periodi di siccità o di disponibilità limitata di sostanze nutritive, permettendo sostanziosi scambi bidirezionali tra piante diverse (Martins, 1993; Simard *et al.*, 1997; Sbrana *et al.*, 2007). Inoltre si osservano forti influenze sulla proliferazione delle popolazioni microbiche rizosferiche, sulla struttura del suolo e sulle successioni vegetali (Courty *et al.*, 2010). Il meccanismo descritto è di vitale importanza proprio negli ambienti mediterranei caratterizzati da una limitata disponibilità d'acqua e sostanze nutritive (Vilà e Sardans, 1999), e pare destinato ad assumere un rilievo crescente se si considera che i modelli previsionali sul cambiamento climatico nell'area mediterranea mostrano un aumento delle temperature medie e una diminuzione delle piogge fino alla fine del ventunesimo secolo (Büntgen *et al.*, 2012).

In definitiva, mentre i benefici per il fungo possono essere riassunti in una pronta disponibilità d'energia che gli consente di completare il ciclo biologico, gli effetti della simbiosi sulla pianta si traducono in una maggiore resistenza a stress d'origine abiotica e biotica di breve-medio periodo, con conseguente mantenimento di uno stato fisiologico, vegetativo e sanitario ottimale anche in presenza di condizioni ambientali avverse.

### 1.3.1 Il ruolo dei batteri nella simbiosi ectomicorrizica

Come spesso accade in ambiente scientifico i recenti studi sulle simbiosi micorriziche hanno aperto nuovi orizzonti per la ricerca biologica, consentendo di rilevare alcune relazioni ecologiche (dirette o indirette) che intercorrono tra le simbiosi micorriziche e gli altri microrganismi presenti comunemente nel suolo, con effetti - sia positivi sia negativi - tali da non poter essere ignorati.

In particolare, all'interno della comunità batterica sono state individuate delle specie, chiamate genericamente *Mycorrhiza Helper Bacteria* (MHB), alle quali sono riconosciuti effetti stimolanti per la formazione del complesso micorrizico (Garbaye, 1994). Con l'avanzare della ricerca si è ritenuto opportuno individuare come “*Mycorrhization Helper Bacteria*” l'insieme dei batteri che promuovono la formazione della simbiosi micorrizica, e con “*Mycorrhiza Helper Bacteria*” l'insieme di quelli che agevolano il mantenimento della stessa nel tempo (Frey-Klett *et al.*, 2007).

Il primo MHB è stato osservato da Mosse nel 1962 associato al fungo endomicorrizico *Rhizophagus* (Mosse, 1962); da allora molti altri MHB sono stati descritti in associazione con questa tipologia di micorrize (lista completa in Frey-Klett *et al.*, 2007). È invece più recente la descrizione dello stesso tipo di fenomeno con i funghi ectomicorrizici e con quelli arbuscolari (Garbaye, 1994; Frey-Klett *et al.*, 2007).

Molti MHB appartengono ai *Proteobacteria Agrobacterium*, *Azobacter*, *Azospirillum*, *Brayrhizobium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*, ma ve ne sono anche tra gli *Actinomycetes* e i *Firmicutes*.

Sebbene della loro ecologia non si conosca ancora molto, appare chiaro che gli MHB non sono specifici di particolari ecosistemi, tanto da essere definiti “generalisti” in grado di associarsi a piante erbacee e legnose in ambienti a clima boreale, temperato, tropicale e mediterraneo. Tuttavia è stato osservato come a seconda dell'ambiente, del fungo e della pianta ospite coinvolti, alcuni MHB possono avere comportamenti contrastanti riguardo la colonizzazione naturale della micorrizosfera, anche con effetti negativi sulla simbiosi micorrizica (Garbaye and Bowen, 1989; Founoune *et al.*, 2002; Frey-Klett *et al.*, 2005; Gryndler *et al.*, 2013).

Attualmente sono molti i filoni di ricerca che, indagando sui meccanismi molecolari, tentano di spiegare l'ecologia di questi gruppi microbici. Stando alle attuali conoscenze sembra alquanto probabile che all'origine di questi effetti vi sia una coevoluzione tra i tre elementi principali di questa simbiosi (Naumann *et al.*, 2010), fin quasi ad ipotizzare che si tratti di una vera e propria simbiosi tripartita (Desirò *et al.* 2015).

Anche la specificità di questi batteri nei riguardi del fungo simbionte, considerata per molto tempo un'importante proprietà degli MHB, mostra aspetti contrastanti. I primi studi in merito hanno evidenziato come gli MHB possono migliorare e velocizzare la formazione della simbiosi micorrizica per alcuni funghi e inibirne quella promossa da altri, palesando anche un certo antagonismo per i patogeni (Garbaye e Duponnois, 1992). Eppure altri studi più recenti hanno dimostrato che, al mutare delle condizioni ambientali, alcuni MHB possono stimolare un grande numero di simbiosi micorriziche (Aspray *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008), o addirittura stimolare sia simbionti che patogeni (Frey-Klett *et al.*, 2007; Lehr *et al.*, 2007).

Alcuni MHB mostrano di avere degli effetti secondari sulla crescita della pianta ospite, per esempio stimolando la formazione di radici secondarie, e per questo sono indicati anche come PGPR, stimolando la formazione delle radici secondarie (Labbé *et al.*, 2014) o modificando la risposta dell'apparato radicale di alcune specie in condizioni di siccità (Hryniewicz *et al.*, 2009; Domínguez-Núñez *et al.*, 2013). Altri MHB sono azotofissatori e rendono maggiormente disponibile questo elemento alle piante ospiti (Li *et al.*, 1992; Paul *et al.*, 2013). Altri ancora sono stati saggiati, con effetti positivi, come agenti di controllo biologico per alcuni patogeni (Lehr *et al.*, 2007; Hernández-Montiel *et al.*, 2013), caratterizzandosi per una non trascurabile capacità di interferire in modo diretto sulla risposta immunitaria della pianta ospite (Cameron *et al.*, 2013; Kurth *et al.*, 2013).

Riguardo gli effetti diretti degli MHB sul fungo simbionte, i meccanismi d'azione sono vari ed alcuni possono essere utilizzati come test in vitro per l'individuazione di nuovi MHB. È importante citare l'aumento della crescita miceliale (Garbaye 1994; Brulé *et al.*, 2001) e/o della densità ifale (Deveau *et al.*, 2007; Aspray *et al.*, 2013; Labbé *et al.*, 2014), spesso ottenuta dai batteri con la produzione di sostanze di cui i funghi sono deficitari (Hildebrandt *et al.*, 2006; Deveau *et al.*, 2010). Si è pure osservata una certa capacità di detossicazione da composti fenolici derivanti dal metabolismo fungino nel terreno di coltura (Duponnois e Garbaye 1990).

È stato ipotizzato che gli effetti sopra descritti possano facilitare la formazione del complesso micorrizico aumentando la possibilità che il fungo in stato pre-simbiontico venga in contatto con l'apparato radicale della pianta ospite (Brulé *et al.*, 2001).

Lo studio delle micorrize e dei batteri correlati deve quindi essere considerato un passaggio fondamentale per arrivare a comprendere appieno i meccanismi implicati nel funzionamento dei diversi sistemi terrestri e nella gestione compatibile delle risorse forestali. Da questo punto di vista esistono già alcune applicazioni pratiche delle conoscenze finora acquisite (Malajczuk *et al.*, 1994).

La simbiosi ectomicorrizica infatti può essere indotta con successo in sede vivaistica mediante l'inoculazione artificiale di una o più specie fungine (Rossi e Montecchio, 2005), ma potrebbe essere agevolata con la co-inoculazione di uno o più “helper” batteri.

Dall'applicazione di queste tecniche produttive nei vivai forestali ci si attende:

- la riduzione della mortalità conseguente alla “crisi da trapianto”, generalmente determinata dal disseccamento o danneggiamento di parte dell'apparato radicale, dal brusco cambiamento dell'ambiente fisico-chimico, dal deficit idrico e dall'impatto con una nuova microflora terricola;
- il rapido sviluppo della vegetazione trapiantata che consentirebbe di diminuire le spese per contrastare la crescita di piante infestanti;
- l'anticipazione dei primi interventi di diradamento con produzione commerciabile e complessiva riduzione dei tempi di coltivazione;
- il miglioramento dei risultati degli impianti di protezione od ornamentali in condizioni estreme (es. impianti in suoli degradati, inquinati, con un'insufficiente o incostante disponibilità di acqua e sostanze nutritive o con presenza di parassiti delle radici);
- la produzione, a seconda delle specie fungine utilizzate, di carpofori eduli di alto valore commerciale (Garbaye *et al.*, 2006);
- la riduzione dell'uso di fertilizzanti, ad esempio negli impianti di pioppo in regime di Short Forestry (Zhao *et al.*, 2014).



#### 1.4. IL *TUBER BORCHII*: VALENZA ECOLOGICA ED ECONOMICA

Tra le diverse specie fungine ectomicorriziche, alcune specie del genere *Tuber* sono di particolare interesse, oltre che per l'importanza ecologica caratterizzante tutti i funghi micorrizici, anche per l'alto valore economico legato alla produzione e al commercio degli ascomi per la gastronomia (Hall *et al.*, 2003; Giomaro *et al.*, 2005; Mello *et al.*, 2006). Si tratta di ascomiceti micorrizici appartenenti all'ordine *Pezizales*, diffusi in Europa, Nord-America e Asia (Bonito *et al.*, 2010), capaci di stabilire una simbiosi mutualistica con le radici sia di angiosperme che di gimnosperme (Trappe, 1979).

Questo genere è naturalmente diffuso nei tre continenti dell'emisfero settentrionale (Europa, Nord America e Asia) e comprende tra 180 e 230 specie (Bonito *et al.*, 2010), 29 delle quali identificate in Europa, Italia compresa (Ceruti *et al.*, 2003). Tra queste, il ***Tuber borchii* Vittad.** (*T. albidum* Pico), chiamato comunemente "bianchetto", è diffuso naturalmente in quasi tutte le regioni italiane; ritrovamenti di ascomi di questo tartufo sono stati segnalati anche in molti altri paesi europei, quali la Finlandia, l'Irlanda, la Polonia e l'Ungheria (Hall *et al.*, 2007).

A maturità i **carpofori** assumono una forma a tubero, lobata o gibbosa, raggiungono dimensioni di 2-3 cm di diametro, come quelle di una nocciola o poco più, generalmente più ridotte rispetto a quelle delle altre specie di tartufi (Bragato, 2006), ed emanano un profumo che richiama quello tipico dell'aglio.

Nei primi stadi di sviluppo la loro superficie può essere pubescente ma diventa liscia a maturità e si mostra di un colore variabile tra il biancastro e il fulvo, con macchie scure o rossastre.

Il **peridio**, o scorza, si mostra liscio e sottile (circa 0,2 mm) formato da cellule sub-globose o poligonali con dimensioni massime di 20 µm e peli di 3,5-5 µm leggermente rastremati verso l'apice.

La **gleba**, o polpa, è chiara tendente al fulvo, fino al violaceo-bruno con numerose venature, larghe, biancastre e ramosi, disposte senza un ordine specifico. Gli aschi, immersi in un'abbondante matrice ifale, contengono da 1 a 4 spore. Gli aschi hanno una forma sub-globosa o elicoidale, non sono peduncolati e misurano circa 80 µm. Le spore sono ellissoidali

o subglobose, hanno dimensioni comprese tra 25 e 40  $\mu\text{m}$ , e sono regolarmente alveolate o reticolate a piccole maglie (Bragato *et al.*, 2006).

Si tratta di una specie dotata di notevole adattabilità ambientale, sviluppandosi dal livello del mare fino ai 1000 metri di quota, su svariate tipologie di terreni, da quelli più sciolti e sabbiosi delle pinete litoranee, a quelli collinari argillosi, pur preferendoli molto drenanti (Gardin, 2005; Raglione, 1997; 2005). Si hanno anche segnalazioni di ritrovamenti di carpofori su terreni a reazione acida. Il *T. borchii* sembra adattarsi sia ai climi caldi e siccitosi, sia a quelli freddi e piovosi, purché si trovi in stazioni ben assolate e illuminate, senza inversione termica e a ridotta incidenza di nebbia. Generalmente preferisce i boschi ad alto fusto di conifere, specialmente del genere *Pinus* (*P. pinea* L, *P. nigra* Arnold e *P. pinaster* Aiton), sia lungo le coste che nei rimboschimenti delle zone interne. È molto diffuso anche nei querceti di *Quercus pubescens* Willd. e *Q. ilex* L., ma anche *Q. suber* L. ed altre latifoglie come *Castanea sativa* Mill. (Zambonelli, 1990). Lo si trova anche in alcune specie della macchia mediterranea come *Arbutus unedo* L. (Lancellotti, 2014). Non mancano i siti legati ad ambienti antropici, quali i filari di piante lungo le strade e in specie come *Alnus cordata* Loisel (Zambonelli, 1990).

Per tutti questi ambienti c'è una certa variabilità nella copertura arborea, anche se si può affermare che la preferenza è per le zone a scarsa copertura di chiome. Molto spesso la produzione di bianchetto si sposta sul margine di un bosco, mentre diminuisce nettamente col progredire della chiusura dello stesso. Inoltre, sembra esservi un'importante relazione fra la produzione di bianchetto e il taglio del ceduo: la quantità di carpofori e la loro pezzatura si eleva notevolmente nei 2-3 anni successivi al taglio, per poi riprendere gradualmente i valori normali (Bragato, 2006).

In Italia, il periodo di fruttificazione è influenzato dal clima: risulta anticipato nelle zone a clima mediterraneo (gennaio-marzo) e ritardato in collina e montagna (marzo-aprile).

Questa ampia adattabilità ecologica ne rende possibile la coltivazione anche in ambienti nei quali le altre specie di tartufi più pregiate non sono in grado di svilupparsi (Iotti *et al.*, 2010), nonostante siano stati ipotizzati importanti cali produttivi per diverse specie di tartufi proprio a causa dei mutamenti climatici, tali da poter stravolgere anche le più prudenti previsioni produttive (Büntgen *et al.*, 2012).

### 1.4.1 I batteri associati al tartufo bianchetto

A partire dagli anni '90, diversi studi microbiologici basati su tecniche di coltivazione vitale o su metodiche DNA-dipendenti hanno messo in luce che diverse strutture micorriziche (ascomi o *tips* ifali) sono habitat di diverse specie batteriche (Barbieri *et al.* 2005, 2007; Antony-Babu *et al.*, 2013), lieviti (Buzzini *et al.*, 2005) e funghi filamentosi (Pacioni *et al.* 2007).

Gli ascomi del *T. borchii*, così come quelli dei funghi ectomicorrizici dello stesso genere, ospitano popolazioni coltivabili di batteri chemi-oganotrofi, con una carica stimata in  $10^5$ - $10^8$  ufc/g p.s. (Citterio *et al.* 1995; Bedini *et al.*, 1999; Barbieri *et al.*, 2005; 2007; Antony-Babu *et al.*, 2014).

Il gruppo dei batteri coltivabili più rappresentato è quello dei *Pseudomonas*, in particolare *P. fluorescens*, *P. corrugata*, *P. tolaasi*, e i Gram positivi sporigeni, appartenenti alla famiglia delle *Bacillaceae*. Tutti gli isolati del genere *Pseudomonas* si sono mostrati capaci di produrre acido indol-3-acetico (Bedini *et al.*, 1999), la prima molecola isolata del gruppo delle auxine (Koegl, 1931). Inoltre *P. fluorescens* e i alcuni rappresentanti delle *Bacillaceae* degradano agevolmente sia la cellulosa che la chitina, componenti strutturali delle pareti ifali, per cui si è suggerito un possibile coinvolgimento degli stessi nell'apertura degli aschi e nella germinazione delle spore (Bedini *et al.*, 1999; Nuti e Sbrana; 2013).

Le tecniche DNA-dipendenti hanno permesso di rilevare in ambiente ascomico vari  $\alpha$ -proteobatteri,  $\gamma$ -proteobatteri e rappresentanti del gruppo dei *Bacteroidetes* come *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, e *Paenibacillus* spp. (Barbieri *et al.*, 2001; Barbieri *et al.* 2005, 2007; Bonfante e Anca, 2009) e tra i vitali non coltivabili un rappresentante del complesso *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (Barbieri *et al.* 2002).

Diversi gruppi batterici producono composti organici solforosi, che contribuiscono al tipico aroma (Buzzini *et al.*, 2005). Tuttavia, studi recenti hanno mostrato che i batteri associati all'ascoma del *T. borchii* sono tra i responsabili del tipico odore, utile ad attrarre mammiferi e particolarmente apprezzato dall'olfatto umano (Splivallo e Maier, 2010; Splivallo *et al.*, 2011; Splivallo *et al.*, 2015a) producendo alcuni derivati del tiofene a partire da estratti ascomici (Splivallo *et al.* 2015b).

## 2. OBIETTIVI DELLA RICERCA

Considerando il principio ecologico secondo il quale l'ambiente seleziona ed orienta le attività dei microrganismi (Winogradsky, 1949), è di particolare importanza conoscere e valutare i fattori che caratterizzano un ecosistema ed i vegetali in esso presenti. In base a questo principio infatti, non sono solo le caratteristiche genetiche dei microrganismi, ma anche l'insieme delle condizioni ambientali a determinare, da un lato, la presenza, lo sviluppo e l'attività di una specie microbica piuttosto che di un'altra e, dall'altro la vitalità o lo stato di latenza e il numero degli individui. Le relazioni che si instaurano tra le differenti popolazioni presenti in un ecosistema, derivano quindi sia da fattori ambientali sia dalle condizioni fisico-chimiche del mezzo in cui viene a collocarsi una comunità microbica. La loro definizione, pertanto, non potrà prescindere da un'attenta acquisizione preliminare di tali conoscenze a valenza stazionale.

Con queste premesse sono state impostate delle ricerche con l'intento di apportare un contributo di conoscenza riguardo tra la comunità batterica terricola dei suoli tartufigeni e la simbiosi micorrizica tra *Quercus ilex* L. e *Tuber borchii* (Tartufo bianchetto) in differenti condizioni pedologiche di due realtà forestali della Sardegna.

Lo studio mira, in particolare, a rilevare la componente batterica del suolo e quella infeudata negli ascomi del *T. borchii*, in due leccete sviluppatesi su suoli a diversa matrice rocciosa con caratteristiche chimico-fisiche diverse, e valutarne le eventuali differenze quantitative tra i siti di campionamento.

Nella fattispecie, questa ricerca è stata indirizzata a:

- rilevare le principali caratteristiche fisico-chimiche di suoli di differente origine situati in aree forestali della Sardegna in cui proliferano consorzi micorrizici di *T. borchii* e piante di *Q. ilex*;
- caratterizzare sotto il profilo tassonomico e metabolico la comunità batterica instauratasi negli stessi suoli tartufigeni e negli ascomi del *T. borchii*.

La scelta di questa particolare simbiosi deriva in parte dalla sua indubbia importanza economica, e in parte dalla considerazione che il leccio in Sardegna rappresenta la vegetazione climacica principale. I boschi di leccio si estendono infatti su ben 247.335 ha,

pari al 42,4% dell'intera superficie boscata della regione, escludendo peraltro da questa valutazione i boschi in cui predomina la consociazione con la macchia mediterranea (Tab. 2).

**Tabella 2: Estensione e tipologia dei boschi in Sardegna (Gasparini, 2011)**

| <b>Tipologie boschive</b>                      | <b>Superficie<br/>(ha)</b> | <b>Coeff. di boscosità<br/>(%)</b> |
|--|----------------------------|------------------------------------|
| Boschi di conifere                             | 48.870                     | 8,38%                              |
| Boschi di latifoglie                           | 499.447                    | 85,60%                             |
| di cui Leccete                                 | 247.335                    | 42,4%                              |
| Arboricoltura da legno                         | 25.567                     | 4,38%                              |
| <b>Totale superficie a bosco<sup>(1)</sup></b> | <b>583.472</b>             | <b>100%</b>                        |
| Altre terre boscate <sup>(1)</sup>             | 629.778                    | 100%                               |
| <b>Superficie forestale totale</b>             | <b>1.213.250</b>           | <b>100%</b>                        |

<sup>(1)</sup> definizione fornita dalle Prescrizioni di massima di polizia forestale RAS - 2006

Di seguito, dopo aver illustrato più in dettaglio le metodiche applicate per svolgere le ricerche, si riportano e commentano i principali risultati conseguiti.

### 3. MATERIALI E METODI

Il lavoro di ricerca è stato sviluppato in 3 fasi, riportate sinteticamente di seguito.

**Fase 1: Indagini in bosco per il prelievo di campioni.** Sono state svolte in 2 aree forestali della Regione, popolate da piante di leccio che insistono su suoli tartufigeni sia acidi che alcalini. In ciascuna area sono stati prelevati:

- campioni di suolo da sottoporre ad analisi chimiche;
- campioni di suolo da sottoporre ad analisi microbiologiche, suddivisi in:
  - campioni di suolo forestale (Bulk soil);
  - campioni di suolo ascomico (Ascocarpic soil);
  - campioni di suolo ectomicorrizico (Mycorrhizal soil).
- campioni di ascomi di *T. borchii* con l'ausilio di cani da tartufo.

**Fase 2: indagini in laboratorio per analisi chimiche dei campioni di suolo.** Le analisi, indirizzate ad individuare le principali caratteristiche fisico-chimiche del suolo forestale tartufigeno, ci hanno consentito di enucleare le caratteristiche che deve avere un suolo per ospitare il *T.borchii*. In particolare sono stati rilevati i parametri di tessitura, pH, conducibilità, capacità di scambio cationico, sostanza organica e le concentrazioni di azoto, fosforo, potassio, ferro e calcare (attivo e totale).

**Fase 3: indagini metaboliche e tassonomiche di comunità batteriche:** Sono state finalizzate alla caratterizzazione della comunità batterica presente nelle due aree d'indagine. In particolare, da tutti i campioni sopracitati si è proceduto all'estrazione, all'isolamento e alla purificazione di una selezione casuale di batteri. -gli isolati derivanti dai due Bulk soils sono stati identificati con tecniche genetiche che prevedono il sequenziamento del rDNA della regione 16S ribosomiale, mentre gli isolati ottenuti dagli ascomi sono stati identificati e caratterizzati metabolicamente con l'uso di piastre metaboliche Gen III<sup>TM</sup> Biolog<sup>®</sup> (Biolog<sup>®</sup> Inc., Hayward, CA, USA) Inoltre, servendosi della tecnica delle Ecoplate<sup>TM</sup> Biolog<sup>®</sup> (Biolog<sup>®</sup> Inc., Hayward, CA, USA), sono state testate metabolicamente le comunità microbiche dei due suoli, al fine di valutarne la biodiversità, l'impronta metabolica e i principali composti chimici utilizzati.

### 3.1. AREA DI STUDIO

Le indagini sono state effettuate in Sardegna in due aree boscate a *Quercus ilex* ubicate nella parte settentrionale e in quella centrale dell'Isola: rispettivamente in località “San Santino”, situata a 454 m s.l.m. in agro del Comune di **Sant’Antonio di Gallura** (OT) – di seguito indicata con l’acronimo (SAG) – e in località “Santa Sofia” situata a 710 m s.l.m. in agro del Comune di **Laconi** (OR) – di seguito indicata con l’acronimo (LSF) – già nota per essere particolarmente vocata alla coltivazione dei tartufi (Boni *et al.*, 1993). Ciascuna di queste aree è stata opportunamente geo-referenziata e caratterizzata sotto il profilo climatico, pedologico e vegetazionale (Tab. 3; Figg. 2, 3).

**Tabella 3: Ubicazione delle due aree di indagine in Sardegna.**

| Acronimo | Sito di indagine                              | Coordinate<br>(Lat/Lon)            | Esposizione | Altitudine<br>(m s.l.m.) |
|----------|---|------------------------------------|-------------|--------------------------|
| SAG      | Sant’Antonio di Gallura<br>(loc. San Santino) | 40° 59' 7.46" N<br>9° 21' 12.65" E | S-W         | 454                      |
| LSF      | Laconi<br>(loc. Santa Sofia)                  | 39° 51' 18.07" N<br>9° 6' 43.19" E | N-E         | 710                      |







**Figura 2: Aspetto della vegetazione nell'area d'indagine SAG in loc. "San Santino".**



**Figura 3: Aspetto della vegetazione nell'area d'indagine LFS in loc. "Santa Sofia".**



### 3.1.1. Inquadramento climatico

Per Arrigoni (1968), entrambe le aree rientrano nell'orizzonte delle foreste mesofile di *Quercus ilex* L., caratterizzate da un clima tipicamente bistagionale, a “regime pluviometrico mediterraneo”, con inverno sub-umido e moderatamente freddo ed estati calde e molto aride. In accordo con Köppen e Geiger (1930), il clima delle due aree è classificabile come *Csb*.

Tuttavia, dall'osservazione dei dati disponibili si osservano alcune differenze microclimatiche rilevanti (Tab. 4). Difatti, l'area di Sant'Antonio di Gallura è soggetta ad un clima caldo e temperato, con una temperatura media di 14,7°C, ed una piovosità media annuale di 618 mm, mentre nell'area di Laconi si sono rilevati una temperatura media di 13,9°C e 714 mm di piovosità media annuale. Anche in considerazione della differenza di quota, stabilita in circa 400 m, nel sito gallurese il mese più freddo è gennaio, con una temperatura media di 8,1°C, mentre nell'altipiano del Sarcidano durante lo stesso mese si hanno 6,8°C. Per entrambe le aree il mese più caldo dell'anno è agosto, con una temperatura media di 22°C.

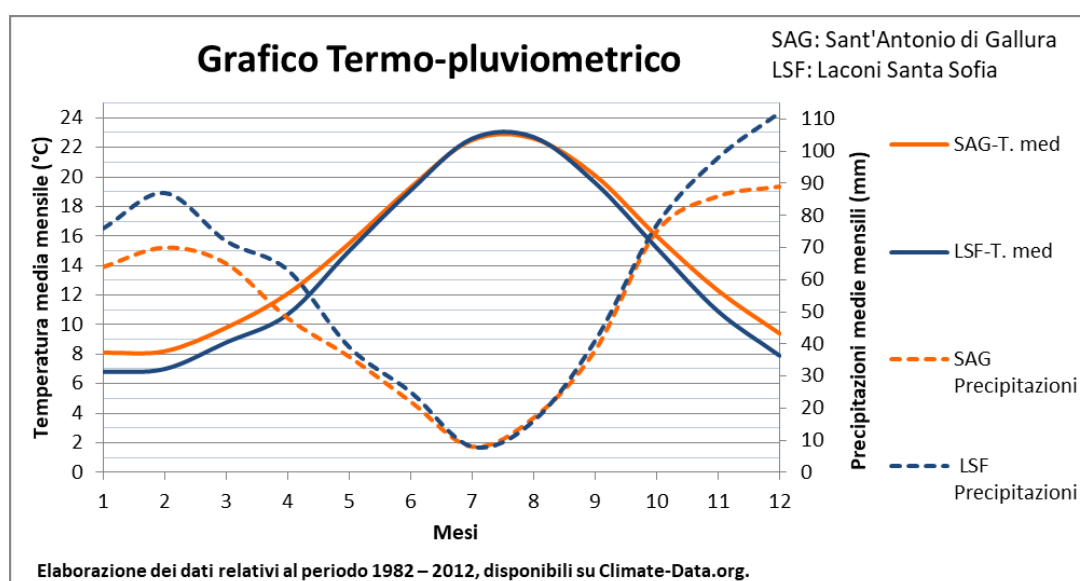


Figura 4: Grafico termo-pluviometrico delle aree di indagine

Notevole anche la differenza tra le precipitazioni del mese più secco e quelle del mese più piovoso: 81 mm per il sito SAG e 104 mm per il sito LSF. Tale differenza è dovuta ad una maggiore piovosità invernale: così se nel sito gallurese, nel mese di dicembre è caduta la maggior parte delle precipitazioni, con una media di 89 mm, nell'altipiano di Laconi si è arrivati invece a 112 mm.

Un sunto delle differenze climatiche tra i due siti è visibile nel grafico termopluviometrico di nostra elaborazione, basato sui dati termopluviometrici (1982 - 2012) disponibili su Climate-Data.org (*Figura 4*).

### **3.1.2. Inquadramento geo-pedologico**

Secondo quanto riportato nella Carta Pedologica della Sardegna (Aru *et al.*, 1991) l'area di Sant'Antonio di Gallura è caratterizzata da rocce intrusive del paleozoico, i cui suoli predominanti sono definiti come Eutric, Dystic and Litic Leptosols Eutritic and Dystric Cambisols, Rock outcrop (FAO classification, 1988), mentre il territorio di Laconi-Santa Sofia è posto su dolomie del mesozoico, le quali hanno generato suoli classificabili come Eutric and lithic Leptosol e Chromic Cambisols Rock outcrop (FAO classification, 1988). Entrambi i siti presentano un'elevata rocciosità e pietrosità superficiale su suolo poco profondo, mediamente attorno ai 25-30 cm, con uno spesso strato di lettiera composta in maggioranza da foglie di leccio in fase di decomposizione, e per il resto da una rada e bassa cotica erbosa.

### **3.1.3. Inquadramento vegetazionale**

Secondo i dati presenti nel Piano Forestale Ambientale Regionale (PFAR) redatto dalla Regione Sardegna nel 2007 (RAS, 2007), il territorio di Sant'Antonio di Gallura ricade all'interno di un distretto siliceo costiero-collinare, in cui le cenosi forestali sono rappresentate prevalentemente da formazioni a sclerofille sempreverdi a dominanza di sughera e di leccio (Arrigoni, 1983). In particolare, il sito di indagine SAG viene inquadrato nella serie sarda, calcifuga, mesomediterranea della sughera SA 20 (*Viola dehnhardtii* – *Quercetum suberis*) in cui il mesobosco risulta dominato da *Q. suber*, altre querce caducifoglie e consociate a *Hedera helix* L., mentre il sottobosco è caratterizzato dalla presenza di *Arbutus unedo* L., *Crataegus monogyna* Jacq., *Erica arborea* L. e *Pyrus spinosa* Forssk.. Tuttavia, a causa delle passate utilizzazioni forestali (ceduo in evoluzione a fustaia), il soprassuolo del punto di campionamento risulta esclusivamente ricoperto da un unico

---

DR. GIOVANNI RAGAGLIA – Studi sulla diversità della comunità batterica associata alla simbiosi ectomicorrizica tra *Tuber borchii* e *Quercus ilex* in differenti ecosistemi forestali della Sardegna

Università degli Studi di Sassari – Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie

Curriculum: Monitoraggio e controllo degli ecosistemi agrari e forestali in ambiente mediterraneo – XXX ciclo

orizzonte dominante di *Q. ilex*, mentre il ridottissimo strato arbustivo consta di una consociazione di *Arbutus unedo*, *Hedera helix*, *Pistacia lentiscus* L. e *Ruscus aculeatus* L.

Sempre dal PFAR, si evince che il territorio di Laconi è interessato dalla serie sarda, calcicola, termo-mesomediterranea del leccio SA 15 (*Prasio majoris-Quercetum ilicis quercetosum virgilianae*) in cui la caratterizzazione floristica dello stadio maturo presenta micro- mesoboschi climatofili a *Q. ilex* e *Quercus virgiliana* (Ten.) Ten., mentre nello strato arbustivo sono presenti *Arbutus unedo*, *Crataegus monogyna*, *Osyris alba* L., *Pistacia lentiscus*, *Rhamnus alaternus* L. e *Viburnum tinus* L. Tuttavia, nell'esatto punto di campionamento LSF, a causa dell'attuale governo a ceduo, oltre ai polloni di leccio si è osservato un sottobosco composto da *Arbutus unedo*, *Juniperus communis*, *Pistacia lentiscus* e *Ruscus aculeatus*.

### 3.2. MODALITÀ DI PRELIEVO E PREPARAZIONE DELLE ANALISI

Nelle due aree descritte in precedenza, a marzo 2015 sono stati raccolti con l'ausilio di due cani da tartufo, 10 ascomi di *T. borchii* (6 nel sito di Santa Sofia e 4 in quello di Sant'Antonio di Gallura) e il suolo aderente agli stessi (Ascocarpic soil), utilizzando strumenti di raccolta precedentemente sterilizzati e provette di prolipopilene da 50 mL sterili.

Inoltre, in ciascun'area sono stati prelevati campioni di suolo forestale (Bulk soil) non direttamente associato agli ascomi, ma comunque in prossimità dell'apparato radicale delle piante di leccio. Questi campioni sono stati raccolti in 4 buche per area, realizzate ad una profondità compresa tra 5 e 25 cm, previa asportazione della cotica erbosa e della lettiera in degradazione. In particolare, il suolo smosso delle buche è stato diviso in due frazioni, una delle quali è stata setacciata per rimuoverne lo scheletro (diametro > 2 mm). Entrambi i campioni ottenuti (circa 300 g ognuno – uno setacciato e l'altro integro), sono stati posti all'interno di 2 differenti sacchetti sterili.

Durante il trasporto dal sito di prelievo al laboratorio, i campioni sono stati conservati in un contenitore termico ad una temperatura di circa 4°C al fine di preservarne l'integrità, rallentare il metabolismo dei batteri e tenere costante l'umidità.

In laboratorio gli ascomi sono stati dapprima ripuliti in ambiente asettico con un leggero spazzolamento superficiale e identificati per via morfologica. Il suolo ascomico è stato separato e raccolto a parte, mentre gli ascomi sono stati spezzati a metà utilizzando delle pinze sterili. Si è preferito evitare il taglio degli ascomi con un bisturi al fine di scongiurare possibili contaminazioni batteriche.

Successivamente, porzioni di peridio e gleba del peso di 0,2 g (peso fresco) sono state prelevate da ciascun ascoma e conservate separatamente in criotubi contenenti 1,8 mL di soluzione di glicerolo al 20% (v/v). Nel contempo, i campioni di suolo sono stati omogeneizzati separatamente in piastre Petri sterili, e ognuno di essi è stato frazionato in 4 sub-campioni di 0,2 g e posto in criotubi contenenti 1 mL di soluzione di glicerolo al 20%. Infine, tutti i criotubi, una volta eseguito un passaggio su Vortex al fine di omogeneizzarne il contenuto, sono stati conservati a -80°C.

I campioni così ottenuti sono stati denominati in funzione della loro provenienza e tipologia come segue: *Granitic Soil Bulk* (GSB), *Granitic Soil Ascocarp* (GSA), *Granitic Ascocarp Peridium* (GAP), *Granitic Ascocarp Gleba* (GAG), *Calcareous Soil Bulk* (CSB), *Calcareous Soil Ascocarp* (CSA), *Calcareous Ascocarp Peridium* (CAP) e *Calcareous Ascocarp Gleba* (CAG). La sigla di ciascun campione è stata poi completata con un numero progressivo per indicarne l'ordine cronologico di raccolta.

Tutte le operazioni sopradescritte sono state eseguite entro 24 ore dal prelievo dei campioni in bosco.

### **3.2.1. Estrazione ed isolamento di batteri**

L'isolamento batterico da tutti i campioni è stato effettuato su Tryptic Soy Agar (TSA), un terreno di coltura universale premiscelato, utilizzato per le conte totali e gli isolamenti di microrganismi da matrici ambientali. Tale terreno è composto da Tryptic Soy Broth (TSB) contenente digerito pancreatico di caseina 1,45%, peptone di soia 0,48%, cloruro di sodio 0,48% (AES Laboratoire Italia s.r.l., Noventa Padovana, Padova, Italia), agarizzato con 15 g/L di Agar tecnico (OXOID, Hampshire, England). Il TSB è stato utilizzato con una concentrazione pari al 10% di quella normalmente prescritta al fine di rallentare la crescita batterica e permettere di ottenere colonie ben separate.

Allo scopo di eseguire le conte batteriche (Cavalli-Sforza, 1966), le 4 repliche di ogni tipologia di campione sono state omogeneizzate in tubi da 50 mL con l'utilizzo di un Vortex per 5 min. Successivamente sono state eseguite le diluizioni seriali sino alla  $10^{-5}$ , piastrate in 3 repliche ed incubate in aerobiosi per 96 ore a 25°C. La conta delle colonie è stata effettuata sia dopo 48 ore, sia dopo 96 ore, allo scopo di rilevare anche i microrganismi a crescita lenta.

Per ottenere le colture pure necessarie allo svolgimento delle analisi identificative, dalle stesse piastre di conta sono stati effettuati dei campionamenti casuali delle colonie che poi venivano purificate mediante strisciamento per 3 volte ad intervalli di 96 ore.

In totale sono stati ottenuti 368 isolati purificati e conservati a -80°C in criotubi contenenti 1,8 mL di soluzione di glicerolo al 20% (v/v) (Tab. 4).

**Tabella 4: Provenienza e numero degli isolati batterici ottenuti**

| <b>Denominazione</b>   | <b>N° campioni saggiati</b> | <b>N° di isolati batterici ottenuti</b> |
|--|-----------------------------|---|
| GSB  | 4                           | 44                                      |
| GSA  | 4                           | 44                                      |
| GAP  | 4                           | 44                                      |
| GAG  | 4                           | 44                                      |
| <b>Campioni Sant’Antonio di Gallura – Totale Isolati batterici</b> |                             | <b>176</b>                              |
| CSB  | 6                           | 48                                      |
| CSA  | 6                           | 48                                      |
| CAP  | 6                           | 48                                      |
| CAG  | 6                           | 48                                      |
| <b>Campioni Laconi– Totale Isolati batterici</b>                   |                             | <b>192</b>                              |
| <b>TOTALE ISOLATI BATTERICI</b>                                    |                             | <b>368</b>                              |

### 3.3. ANALISI CHIMICHE DEI CAMPIONI DI SUOLO

Su ogni campione di suolo proveniente dai siti indagati sono stati determinati i valori di tessitura, pH, conducibilità elettrica, sostanza organica, capacità di scambio cationico, e quelli di concentrazione dei macronutrienti (azoto, fosforo, potassio) e di ferro e calcare (attivo e totale).

Le metodiche delle analisi chimiche, di cui si riportano di seguito le parti salienti, sono reperibili in modo completo su “Metodi di analisi chimica del suolo” a cura di Pietro Violante (2000).

#### 3.3.1. pH e conduttività elettrica

La determinazione del pH per via potenziometrica è stata condotta su suolo essiccato all'aria e privato dello scheletro, utilizzando un pH-metro con elettrodo di vetro (Hanna Instruments HI 9321). Sono stati pesati 10 g di terra fina in un contenitore da 50 mL, quindi sono stati aggiunti 25 mL di H<sub>2</sub>O (rapporto suolo/H<sub>2</sub>O = 1/2,5).

Il campione è stato tenuto in agitazione per almeno 2 ore e quindi lasciato sedimentare per alcuni minuti, dopodiché si è introdotto l'elettrodo nel surnatante per rilevare il valore di pH.

Ai fini della misurazione della conduttività elettrica si è optato per la determinazione diretta (strumentale) in estratto 2:1 acquoso del suolo. In un matraccio conico di Erlenmeyer da 500 mL sono stati diluiti 100 g del campione di terra fine in 200 mL di H<sub>2</sub>O. La soluzione quindi è stata posta in agitazione meccanica per 15 minuti in agitatore orbitante (Modello 4518 Forma Scientific, Inc.) a 250 rpm e lasciata poi a riposo per 12 h. Successivamente, dopo aver filtrato la soluzione in carta Whatman n° 42, è stata misurata la conduttività elettrica utilizzando un'apparecchiatura (WTW 1F10-220 Inolab Level 1 Multiparameter Meter) che fornisce direttamente i valori di conduttività in milliSiemens riportati a 25°C.

### 3.3.2. Tessitura del suolo

Per la determinazione della quantità di frazioni granulometriche di maggior diametro (scheletro e sabbia grossa), è stato eseguito un setacciamento meccanico di 500 g di suolo, utilizzando dei setacci sovrapposti, con maglie di 2 mm e 0,2 mm. Per la determinazione delle frazioni granulometriche inferiori si è utilizzato il metodo della pipetta il quale si basa sul prelievo della sospensione di particelle con diametro inferiore a 200  $\mu\text{m}$  a diverse altezze ed a tempi prestabiliti, ricavabile dalla legge di Stokes in cui si sostituisce la velocità ( $v$ ) con il rapporto spazio diviso tempo ( $h/t$ ).

Per avere una massa sufficiente delle diverse particelle con diametro inferiore a 2000  $\mu\text{m}$ , sono stati utilizzati 50 g di terra fine con aggiunta di 10 mL di una soluzione di sodio esametafosfato e sodio carbonato (250 mL  $\text{H}_2\text{O}$  + 40 g di  $[(\text{NaPO}_3)_6]$  + 10 g di  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ ), dei quali è stata determinata l'esatta concentrazione. Successivamente alla dispersione chimico-fisica e fisica, la sospensione è stata trasferita nel sedimentatore (cilindro da 1000 mL), facendola passare per un setaccio a maglie da 200  $\mu\text{m}$ . Si è quindi eseguito un lavaggio con acqua (precedentemente portata alla temperatura alla quale deve avvenire la sedimentazione), che veniva aggiunta al cilindro sempre tramite il setaccio. Raggiunto il giusto grado di limpidezza delle acque di lavaggio, il materiale rimanente è stato trasferito in un pesafiltro di vetro, previa evaporazione a bagnomaria ed essiccazione in stufa a 105°C. Il tutto quindi è stato pesato ad avvenuto raffreddamento e la massa è stata registrata. La sospensione raccolta nel cilindro è stata portata al volume di 1000 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  ed agitata in bagno termostato o in ambiente termostato (20°C).

Per ogni frazione di particelle, nel rispetto dei tempi riportati come segue:

| Dimensione dei sedimenti | Tempo di sedimentazione | Profondità di prelievo |
|--------------------------|-------------------------|------------------------|
| < 50 $\mu\text{m}$       | 1 min 55 sec            | 25 cm                  |
| < 20 $\mu\text{m}$       | 4 min 48 sec            | 10 cm                  |
| < 2 $\mu\text{m}$        | 8 h                     | 10 cm                  |
| < 2 $\mu\text{m}$        | 4 h                     | 5 cm                   |

sono stati prelevati con una pipetta 5 mL di sospensione, poi trasferiti in una capsula tarata.

A seguito dell'evaporazione dell'acqua a bagnomaria e dell'essiccazione in stufa a 105°C, la capsula è stata fatta raffreddare in essiccatore e poi pesata.



Dal peso, con gli opportuni aggiustamenti (Violante, 2000), si è ricavata la quantità espressa in g/kg di suolo delle diverse frazioni di particelle.

### **3.3.3. Contenuto e qualità della sostanza organica**

L'estrazione delle sostanze umiche è stata effettuata con pirofosfato di sodio 0,05M tamponato a pH 9 (forza ionica 0,5M). La determinazione del carbonio umico è stata eseguita con il metodo del bicromato di potassio (Violante, 2000).

**Metodica di determinazione dell'humus totale.** In una beuta contenente 100 mL di pirofosfato di sodio 0,05M è stato introdotto 1 g di terra fine, poi posto in agitazione per 14 h. Successivamente, si è proceduto a centrifugare la soluzione ed accantonare il surnatante, mentre il residuo è stato sospeso nuovamente nella soluzione estraente. Questa operazione è stata ripetuta per 2 volte con le stesse modalità al fine di ottenere un'estrazione completa.

I 3 estratti ottenuti sono quindi stati riuniti per procedere alla determinazione del carbonio umico. A tale scopo sono stati prelevati 20 mL di estratto totale e posti in un pallone da 250 mL, contenete 10 mL di  $K_2Cr_2O_7$  (1N) e 20 mL di  $H_2SO_4$  concentrato e portato all'ebollizione. Non prima di averla opportunamente lasciata raffreddare, la soluzione è stata diluita con 100 mL di  $H_2O$  distillata; quindi è stata eseguita la titolazione del bicromato in eccesso a freddo con sale di Mohr 0,5N in presenza di indicatore o-fenantrolina (2 gocce) fino a viraggio da verde a rosso persistente. Contemporaneamente sono state eseguite 2 prove in bianco. Il contenuto di humus totale è stato calcolato con la formula di Walkley e Black (1934).

**Metodica di determinazione delle frazioni umiche e fulviche:** in un matraccio da 50 mL sono stati introdotti 40 mL di estratto e 4 mL di  $H_2SO_4$  concentrato. Dopo circa 2 h, il contenuto è stato travasato in una cuvetta e centrifugato per 5 min a 5000 giri/min. Sono quindi stati prelevati 25 mL di surnatante ed è stata determinata la frazione di carbonio organico (fulvico) mediante ossidazione con  $K_2Cr_2O_7$  (1N), titolato come descritto in precedenza. Dal risultato della titolazione, la determinazione della quantità percentuale degli acidi fulvici sulla sostanza umica totale è stata calcolata con le apposite formule, mentre la quantità di acidi umici è stata ottenuta per differenza sul totale della sostanza organica rilevata (Violante, 2000).

Sono stati calcolati inoltre:

- **grado di umificazione (DH)**, parametro quali-quantitativo che fornisce informazioni sul contenuto percentuale in sostanze uniche relativamente alla frazione estraibile (Ciavatta *et al.*, 1990). DH oscilla tra 0 e 100, e tanto più è elevato tanto più è elevata l'attitudine del suolo a umificare i materiali organici disponibili.
- **indice di umificazione (HI)**, infine, è un parametro adimensionale proposto da (Sequi *et al.*, 1986), che indica il rapporto tra la sostanza organica estratta non umificata e quella umificata. L'indice oscilla tra 0 e 1 ed è tanto più basso quanto più i processi di umificazione prevalgono su quelli di mineralizzazione.

#### **3.3.4. Contenuto in fosforo, potassio, ferro, carbonio e azoto**

Per la determinazione di questi elementi è stata utilizzata la metodica che prevede la mineralizzazione parziale dei composti contenenti potassio con l'impiego dell'acido solforico, perossido di idrogeno e acido fluoridrico. In particolare, 0,5 g di terra fine setacciata a 0,2 mm e macinata in mortaio, è stata posta in un contenitore in teflon da 100 mL, quindi sono stati aggiunti 5mL di acido solforico (96%) e in seguito ad una leggera e breve agitazione, sono stati addizionati 3,5 mL di perossido di idrogeno (30%); ad ossidazione avvenuta, sono stati aggiunti 1,5 mL di acido fluoridrico (50%). La soluzione è stata quindi riscaldata a 70°C per 12 min e, una volta raffreddata, è stata portata a volume con H<sub>2</sub>O, omogeneizzata e filtrata su carta Whatman n° 42. Sono state preparate anche diverse prove bianche. La soluzione ottenuta dalla preparazione del campione è stata quindi divisa in 3 frazioni che sono state analizzate separatamente per rilevare i quantitativi, espressi in mg/kg, dei tre elementi:

- **fosforo:** il contenuto in fosforo è stato determinato per via spettrofotometrica UV visibile (UV/vis Spectrometer Lambda Bio 20 – Perkin Elmer Inc. – U.S. Instrumental division Norwalk, USA) (Violante, 2000).
- **potassio e ferro:** il contenuto in potassio e ferro è stato determinato per via spettrofotometrica ad assorbimento atomico (AA Spectrometer 3300 –Perkin Elmer Inc. – U.S. Instrumental division Norwalk, USA).

Per la determinazione del contenuto in carbonio e azoto è stato utilizzato un analizzatore elementare (CN628 Leco Corporation – Saint Joseph, Michigan USA) che consente l'analisi

automatica dei campioni (metodiche e utilizzo dello strumento in <https://it.leco-europe.com/product/chn628-series/>).

### **3.3.6. Calcare attivo e calcare totale**

Il calcare totale è stato determinato tramite calcimetro di Dietrich-Frühling e tecnica gas-volumetrica della CO<sub>2</sub> svolta trattando un campione di terra fine con acido cloridrico. Nel contenitore del calcimetro è stato trasferito 1 g di campione di terra fine, seccato all'aria e setacciato insieme ad una provetta di plastica contenente 10 mL di soluzione diluita di HCl (1:1 v/v). Una volta impostato il calcimetro, è stata fatta sviluppare la CO<sub>2</sub> inclinando il contenitore in modo che l'HCl, fuoriuscendo dalla provetta di plastica, venisse a contatto col campione. A completo sviluppo della CO<sub>2</sub> (indicativamente 1-3 minuti) è stato misurato il volume sviluppato ed applicata la formula espressa nella metodica (Violante, 2000).

Per convenzione, il contenuto di calcare attivo viene determinato facendo reagire a freddo un campione di terra fine con un eccesso di soluzione di ammonio ossalato. La quantità di ammonio ossalato che non ha reagito viene valutata per titolazione con soluzione di potassio permanganato. Perciò in un matraccio tarato da 250 mL sono stati trasferiti 10 g del campione di terra fine per portarli a volume con una soluzione di ammonio ossalato (0,1 moli/L); dopo 2 h di agitazione la sospensione è stata filtrata. Quindi sono stati prelevati 10 mL del filtrato e posti in matraccio conico di Erlenmeyer da 250 mL al quale sono stati aggiunti 15 mL di soluzione di acido solforico (1:10 v/v) e 70 mL di H<sub>2</sub>O. È stata poi eseguita la titolazione a caldo (80°C) con la soluzione di KMnO<sub>4</sub> fino ad ottenere colorazione rosa persistente.

### **3.3.7. Capacità di scambio cationico**

Per la determinazione della capacità di scambio cationico (CSC) è stata utilizzata la metodica che prevede la saturazione del campione con cloruro di bario a pH 8,2 e della trietanolammina (ISO 11260). Sono stati posti 2 g di terra fina in un tubo da centrifuga e, una volta registrato il peso lordo, sono stati aggiunti 25 mL di soluzione di bario cloruro (BaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O) a pH 8,2 e il tutto è stato posto in agitazione per 1 h.

Successivamente è stata eseguita una centrifugazione a 3000 rpm e la soluzione risultante è stata trasferita in un matraccio da 100 mL. Questa operazione è stata ripetuta per 3 volte in totale. Quindi il tutto è stato portato a volume con la stessa soluzione di bario,

misurandone l'acidità totale. Il campione è stato poi lavato con 30 mL di H<sub>2</sub>O e una volta centrifugato, si è registrato nuovamente il peso lordo. Sono stati aggiunti 25 mL di soluzione di magnesio solfato e il tutto è stato posto in agitazione sino alla dispersione completa del campione (5 min), poi centrifugata. A 10 mL della soluzione così ottenuta sono stati aggiunti 100 mL di H<sub>2</sub>O e 10 mL di una soluzione tampone a pH 10, più una piccola quantità di indicatore. È stata inoltre preparata una prova in bianco.

Infine è stata eseguita la titolazione del campione e della prova in bianco con una soluzione di EDTA sino ad ottenere un viraggio in tonalità azzurra. La CSC è stata espressa in cmol/kg applicando le formule riportate in metodica (Violante, 2000).

### 3.4. ANALISI DELL'IMPRONTA METABOLICA DELLE COMUNITÀ MICROBICHE

Per l'analisi dell'impronta metabolica delle comunità microbiche del suolo è stata utilizzata una piastra metabolica Ecoplate<sup>TM</sup> contenente 31 (32 con il pozzetto di controllo) substrati diversi ripetuti tre volte per ogni piastra: in base a precedenti ricerche ed osservazioni (Burkhardt *et al.*, 1993; Haack *et al.*, 1995; Hitzl *et al.*, 1997) questi substrati sono parsi i più efficienti al fine di caratterizzare l'attività delle comunità microbiche estratte da matrici ambientali (Fig. 5).

|                                    |                                       |   |                                  |                                    |                                       |   |                                  |                                    |                                       |   |                                  |
|------------------------------------|---------------------------------------|---|----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|---|----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|---|----------------------------------|
| A1<br>Water                        | A2<br>β-Methyl-D-<br>Glucoside        | A3<br>D-Galactonic<br>Acid<br>γ-Lactone | A4<br>L-Arginine                 | A1<br>Water                        | A2<br>β-Methyl-D-<br>Glucoside        | A3<br>D-Galactonic<br>Acid<br>γ-Lactone | A4<br>L-Arginine                 | A1<br>Water                        | A2<br>β-Methyl-D-<br>Glucoside        | A3<br>D-Galactonic<br>Acid<br>γ-Lactone | A4<br>L-Arginine                 |
| B1<br>Pyruvic Acid<br>Methyl Ester | B2<br>D-Xylose                        | B3<br>D-<br>Galacturonic<br>Acid        | B4<br>L-Asparagine               | B1<br>Pyruvic Acid<br>Methyl Ester | B2<br>D-Xylose                        | B3<br>D-<br>Galacturonic<br>Acid        | B4<br>L-Asparagine               | B1<br>Pyruvic Acid<br>Methyl Ester | B2<br>D-Xylose                        | B3<br>D-<br>Galacturonic<br>Acid        | B4<br>L-Asparagine               |
| C1<br>Tween 40                     | C2<br>L-Erythritol                    | C3<br>2-Hydroxy<br>Benzoic Acid         | C4<br>L-<br>Phenylalanine        | C1<br>Tween 40                     | C2<br>L-Erythritol                    | C3<br>2-Hydroxy<br>Benzoic Acid         | C4<br>L-<br>Phenylalanine        | C1<br>Tween 40                     | C2<br>L-Erythritol                    | C3<br>2-Hydroxy<br>Benzoic Acid         | C4<br>L-<br>Phenylalanine        |
| D1<br>Tween 80                     | D2<br>D-Mannitol                      | D3<br>4-Hydroxy<br>Benzoic Acid         | D4<br>L-Serine                   | D1<br>Tween 80                     | D2<br>D-Mannitol                      | D3<br>4-Hydroxy<br>Benzoic Acid         | D4<br>L-Serine                   | D1<br>Tween 80                     | D2<br>D-Mannitol                      | D3<br>4-Hydroxy<br>Benzoic Acid         | D4<br>L-Serine                   |
| E1<br>α-<br>Cyclodextrin           | E2<br>N-Acetyl-D-<br>Glucosamine      | E3<br>γ-<br>Hydroxybutyric<br>Acid      | E4<br>L-Threonine                | E1<br>α-<br>Cyclodextrin           | E2<br>N-Acetyl-D-<br>Glucosamine      | E3<br>γ-<br>Hydroxybutyric<br>Acid      | E4<br>L-Threonine                | E1<br>α-<br>Cyclodextrin           | E2<br>N-Acetyl-D-<br>Glucosamine      | E3<br>γ-<br>Hydroxybutyric<br>Acid      | E4<br>L-Threonine                |
| F1<br>Glycogen                     | F2<br>D-<br>Glucosaminic<br>Acid      | F3<br>Itaconic Acid                     | F4<br>Glycyl-L-<br>Glutamic Acid | F1<br>Glycogen                     | F2<br>D-<br>Glucosaminic<br>Acid      | F3<br>Itaconic Acid                     | F4<br>Glycyl-L-<br>Glutamic Acid | F1<br>Glycogen                     | F2<br>D-<br>Glucosaminic<br>Acid      | F3<br>Itaconic Acid                     | F4<br>Glycyl-L-<br>Glutamic Acid |
| G1<br>D-Cellobiose                 | G2<br>Glucose-1-<br>Phosphate         | G3<br>α-Ketobutyric<br>Acid             | G4<br>Phenylethyl-<br>amine      | G1<br>D-Cellobiose                 | G2<br>Glucose-1-<br>Phosphate         | G3<br>α-Ketobutyric<br>Acid             | G4<br>Phenylethyl-<br>amine      | G1<br>D-Cellobiose                 | G2<br>Glucose-1-<br>Phosphate         | G3<br>α-Ketobutyric<br>Acid             | G4<br>Phenylethyl-<br>amine      |
| H1<br>α-D-Lactose                  | H2<br>D,L-α-<br>Glycerol<br>Phosphate | H3<br>D-Malic Acid                      | H4<br>Putrescine                 | H1<br>α-D-Lactose                  | H2<br>D,L-α-<br>Glycerol<br>Phosphate | H3<br>D-Malic Acid                      | H4<br>Putrescine                 | H1<br>α-D-Lactose                  | H2<br>D,L-α-<br>Glycerol<br>Phosphate | H3<br>D-Malic Acid                      | H4<br>Putrescine                 |

Figura 5: Fonti di carbonio presenti in micropiastra Biolog® Ecoplates<sup>TM</sup>

Su ciascun substrato si possono sviluppare una o più specie di microrganismi, in grado di utilizzare quell'unica fonte di carbonio presente. La colorazione di ciascun pozzetto, dovuta alla riduzione dei sali di tetrazolio in formazano, è quindi il frutto dell'attività metabolica della comunità presente nella matrice naturale. I pozzetti non colorati, indicano l'assenza nel campione e presumibilmente nella comunità, di specie in grado di utilizzare quel particolare substrato.

La densità dell'inoculo ha un'enorme importanza nel definire la velocità e la cinetica di colorazione dei pozzetti: in ogni pozzetto infatti si innescano fenomeni di competizione per il

substrato fra microrganismi caratterizzati da velocità di crescita differenti. Soprattutto nei pozzetti contenenti substrati utilizzabili da un'ampia gamma di microrganismi il colore si sviluppa molto rapidamente, mentre nei substrati di difficile degradazione i tempi di colorazione potrebbero essere più lunghi perché determinati dalla crescita di microrganismi con un metabolismo specifico, ma più lento. A tal proposito va sottolineato che gli studi di ecologia microbica e le osservazioni fatte sui meccanismi di competizione per lo spazio e per il substrato nelle piastre Petri valgono in una certa misura anche per i pozzetti delle piastre Biolog<sup>®</sup>. I microrganismi caratterizzati da una strategia di sviluppo di tipo “r” (Boyce, 1984) - pertanto aggressivi e veloci nel colonizzare il substrato - sono quelli che determinano nella maggior parte dei casi l'impronta metabolica della comunità studiata. La presenza dei microrganismi a selezione “k”, spesso dotati di enzimi specifici per substrati rari ma al contempo caratterizzati da una scarsa competitività ed una crescita lenta, possono contribuire alla colorazione dei pozzetti della piastra soltanto in tempi lunghi e/o in assenza di specie “r”.

Le piastre Biolog<sup>®</sup> contengono fonti di carbonio comunemente ritrovate negli essudati radicali delle piante, quindi il loro uso è ecologicamente più indicato per caratterizzare la comunità microbica rizosferica (Campbell *et al.*, 1997).

#### ***3.4.1. Protocollo di inoculo e incubazione di piastre Ecoplates<sup>TM</sup>***

Le cellule microbiche sono state estratte dai 2 campioni di suolo prelevati in campo, preventivamente setacciati.

In una beuta da 500 mL contenente 180 mL di soluzione di Ringer (Ringer solution tablets, OXOID, Hampshire, England) sono stati aggiunti, in condizioni di sterilità, 20 g del campione, per costituire una diluizione 1:10 di suolo. La sospensione è stata messa ad agitare per 30 min in un agitatore orbitante (Modello 4518 Forma Scientific, Inc.) a 250 rpm. Il numero dei microrganismi totali presenti è stato poi standardizzato (approssimativamente 104 ufc/mL) attraverso la centrifugazione: 20 mL di questa sospensione microbica sono stati distribuiti in 4 provette da centrifuga dispensando in ognuna di esse 5 mL. La centrifugazione è stata effettuata per 5 min a 2000 rpm, e da ogni provetta sono stati recuperati 4 mL del surnatante (16 mL in totale) che sono stati utilizzati per l'inoculo delle Ecoplates<sup>TM</sup>.

Dopo la centrifugazione è stata effettuata la conta microbica (ufc/mL) del surnatante che andava a costituire l'inoculo delle Ecoplates<sup>TM</sup> su piastre Petri contenente TSA.

Le piastre Ecoplates™ sono state inoculate in ragione di 100 µL per pozzetto e lette al tempo zero (subito dopo la semina) dopodiché sono state incubate a 28°C per 168 h. Le informazioni che si possono ottenere dalla lettura delle piastre sono molteplici ed i tempi e le modalità d'incubazione possono cambiare sensibilmente secondo le necessità; in generale per inoculi con elevata densità o preparati da matrici con elevata attività microbica, può essere sufficiente un'incubazione di poche ore per ottenere l'idonea colorazione dei pozzetti. Se lo scopo dell'analisi è la valutazione delle cinetiche di colorazione è necessario effettuare più letture, possibilmente ad intervalli regolari nel tempo.

La frequenza ed il numero di osservazioni sono funzione dell'accuratezza richiesta e della rapidità del processo. Le letture della densità ottica sono state eseguite per mezzo di un lettore per micropiastre (Emax) a 590 nm ed a 750 nm. Le misure sono state effettuate una prima volta dopo l'inoculo (come detto in precedenza, ovvero al tempo zero) quindi ogni 24 h per otto giorni (168 h).

Dall'elaborazione delle letture ottenute sono stati calcolati:

- **Valore medio di colorazione dei pozzetti (AWCD):** si tratta di una misura di attività totale, che riassume per ogni piastra e per ciascun tempo di incubazione, la risposta metabolica dei microrganismi (Garland e Mills, 1991);
- **Diversità funzionale (H')**: quest'indice restituisce una misura della biodiversità di un ecosistema ed è stato utilizzato per la caratterizzazione della diversità funzionale. Tiene conto sia del numero di substrati utilizzati, che del loro diverso grado di utilizzazione (non tiene però conto del tipo di substrato utilizzato) (Zak *et al.*, 1994);
- **Richness:** è un indice di diversità funzionale, che tiene conto esclusivamente del numero dei differenti substrati utilizzati da una comunità microbica. Si tratta di un indice che possiede una dimensione temporale poiché durante l'incubazione, il numero di pozzetti che man mano si colora può aumentare (Zak *et al.*, 1994);
- **Utilizzo dei diversi substrati:** valuta le diverse tipologie di substrato utilizzato riunite per macro-categorie: zuccheri e zuccheri derivati, zuccheri fosfati, acidi carbossilici, aminoacidi e polimeri.

### 3.5. IDENTIFICAZIONE GENETICA DEI BATTERI DEL SUOLO

L'identificazione tassonomica dei 184 ceppi batterici isolati dai campioni di suolo forestale e suolo ascomico (GSA; GSB, CSA, CSB) è stata realizzata tramite sequenziamento del rRNA della regione 16S ribosomiale. La PCR è stata eseguita con prelievo diretto dalle colonie purificate precedentemente, previa lisi cellulare per shock termico (1 min a 80°C). Gli ampliconi sono stati ottenuti utilizzando i primers universali pA (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) (Edwards *et al.*, 1989; Eden *et al.*, 1991) e 907R (CCGTCAATTCMTTGTG AGTTT) (Muyzer *et al.*, 1993; Rölleke *et al.*, 1998). Il mix per l'analisi molecolare degli isolati batterici è stato realizzato in 50-µL (volume totale) contenenti 26 µL H<sub>2</sub>O DNA/RNA free, 20 µL 2,5 5Prime Mastermix (PCR SuperMix, ThermoFisher Scientifics Inc.) 10 µM primers, e 2 µL di estratto cellulare. Il ciclo di amplificazione PCR (Applied Biosystems™ 2720 Thermal Cycler) prevedeva: 95°C per 5 min, 30 cicli di 1 min a 95°C (denaturazione), 56°C per 1 min (annealing), seguita da 72°C per 1,5 min (estensione). La reazione si è conclusa con la fase finale di estensione a 72°C per 10 min. Oltre ad una prima quantificazione con l'utilizzo di un NanoDrop™ (Thermo Scientific Inc.), i prodotti della PCR sono stati testati tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio (1% w/v), utilizzando il Bromuro di 3,8-diammino-5-etil-6-fenilfenantridinio come intercalante, al fine di verificare l'effettiva riuscita del processo. La restante frazione è stata purificata dai contaminanti fenolici e residui di DNA con l'uso del kit di purificazione RNeasy Plus (Qiagen, France). I prodotti purificati sono stati sequenziati presso il centro Eurofins Genomics in Germania (Eurofins Scientific Group) e le sequenze sono state poi comparate con quelle contenute nei database *Ribosomal Database Project* (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu/>) (Cole, 2013).



### 3.6. IDENTIFICAZIONE METABOLICA DEI BATTERI DELL'ASCOMA

Dei 184 isolati totali, una selezione casuale del 20%, pari a 36 ceppi, ottenuti dai campioni dalle porzioni ascomiche (GAP; GAG; CAP; CAG) è stata avviata all'identificazione attraverso l'utilizzo di piastre metaboliche Biolog® Gen III™ che permettono di eseguire contemporaneamente 94 test biochimici e delineare quindi il profilo metabolico di un ampio numero di batteri, appartenenti sia al gruppo dei Gram-negativi sia a quello dei Gram-positivi (Bochner, 1989a; 1989b). Utilizzando il software Biolog's Microbial Identification System – che permette di confrontare i profili metabolici ottenuti, ovvero l'impronta fenotipica, con quelli presenti nel OmniLog Data Collection® (ODC) – è possibile identificare l'isolato batterico oggetto di studio. I 96 pozzetti della piastra contengono 71 fonti diverse di carbonio, 23 test di sensibilità, e 2 controlli, uno negativo e uno positivo (Fig. 6). Come per le Ecoplates™ l'attività microbica è rilevabile dalla reazione colorimetrica dei sali di tetrazolio, letti a 590 nm ed a 750 nm.

|                                   |                            |                                  |                                  |                           |                              |                                |                                |                                |                          |                           |                            |
|-----------------------------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|
| A1<br>Negative Control            | A2<br>Dextrin              | A3<br>D-Maltose                  | A4<br>D-Trehalose                | A5<br>D-Cellobiose        | A6<br>Gentiobiose            | A7<br>Sucrose                  | A8<br>D-Turanose               | A9<br>Stachyose                | A10<br>Positive Control  | A11<br>pH 6               | A12<br>pH 5                |
| B1<br>D-Raffinose                 | B2<br>α-D-Lactose          | B3<br>D-Melibiose                | B4<br>β-Methyl-D-Glucoside       | B5<br>D-Salicin           | B6<br>N-Acetyl-D-Glucosamine | B7<br>N-Acetyl-β-D-Mannosamine | B8<br>N-Acetyl-D-Galactosamine | B9<br>N-Acetyl-Neuraminic Acid | B10<br>1% NaCl           | B11<br>4% NaCl            | B12<br>8% NaCl             |
| C1<br>α-D-Glucose                 | C2<br>D-Mannose            | C3<br>D-Fructose                 | C4<br>D-Galactose                | C5<br>3-Methyl Glucose    | C6<br>D-Fucose               | C7<br>L-Fucose                 | C8<br>L-Rhamnose               | C9<br>Inosine                  | C10<br>1% Sodium Lactate | C11<br>Fusidic Acid       | C12<br>D-Serine            |
| D1<br>D-Sorbitol                  | D2<br>D-Mannitol           | D3<br>D-Arabitol                 | D4<br>myo-Inositol               | D5<br>Glycerol            | D6<br>D-Glucose-6-PO4        | D7<br>D-Fructose-6-PO4         | D8<br>D-Aspartic Acid          | D9<br>D-Serine                 | D10<br>Troleandomycin    | D11<br>Rifamycin SV       | D12<br>Minocycline         |
| E1<br>Gelatin                     | E2<br>Glycyl-L-Proline     | E3<br>L-Alanine                  | E4<br>L-Arginine                 | E5<br>L-Aspartic Acid     | E6<br>L-Glutamic Acid        | E7<br>L-Histidine              | E8<br>L-Pyrogutamic Acid       | E9<br>L-Serine                 | E10<br>Lincomycin        | E11<br>Guanidine HCl      | E12<br>Niaproof 4          |
| F1<br>Pectin                      | F2<br>D-Galacturonic Acid  | F3<br>L-Galactonic Acid Lactone  | F4<br>D-Gluconic Acid            | F5<br>D-Glucuronic Acid   | F6<br>Glucuronamide          | F7<br>Mucic Acid               | F8<br>Quinic Acid              | F9<br>D-Saccharic Acid         | F10<br>Vancomycin        | F11<br>Tetrazolium Violet | F12<br>Tetrazolium Blue    |
| G1<br>p-Hydroxy-Phenylacetic Acid | G2<br>Methyl Pyruvate      | G3<br>D-Lactic Acid Methyl Ester | G4<br>L-Lactic Acid              | G5<br>Citric Acid         | G6<br>α-Keto-Glutaric Acid   | G7<br>D-Malic Acid             | G8<br>L-Malic Acid             | G9<br>Bromo-Succinic Acid      | G10<br>Nalidixic Acid    | G11<br>Lithium Chloride   | G12<br>Potassium Tellurite |
| H1<br>Tween 40                    | H2<br>γ-Amino-Butyric Acid | H3<br>α-Hydroxy-Butyric Acid     | H4<br>β-Hydroxy-D,L-Butyric Acid | H5<br>α-Keto-Butyric Acid | H6<br>Acetoacetic Acid       | H7<br>Propionic Acid           | H8<br>Acetic Acid              | H9<br>Formic Acid              | H10<br>Aztreonam         | H11<br>Sodium Butyrate    | H12<br>Sodium Bromate      |

Figura 6: Fonti di carbonio presenti in micropiastra Biolog® Gen III™

### **3.6.1. Protocollo di inoculo e incubazione di piastre GEN III®**

Dalle piastre di isolamento, ed in particolare da colonie isolate, sono state prelevate piccolissime quantità di inoculo batterico, le quali sono state poste in soluzione (sino ad una trasmittanza compresa tra 90-98%) in apposito liquido di inoculo Biolog® IF tipe A - utilizzato per la maggior parte delle specie batteriche - e di seguito omogeneizzate per agitazione tramite vortex, per 30 secondi a bassa intensità (Modello TK3S TecnoKartel, Inc). Le piastre sono state inoculate con 100 µL per pozzetto ed incubate a 30°C per il tempo necessario all'identificazione, di norma compreso tra 3 e 36 ore.

### **3.6.2. Profilo metabolico medio degli isolati batterici**

I diversi profili metabolici, raggruppati per provenienza (CAG, CAP, GAG e GAP) sono stati standardizzati rispetto al tempo di incubazione e successivamente mediati al fine di ottenere un profilo metabolico medio. Questa elaborazione ha permesso di rilevare quali siano i composti maggiormente utilizzati dai batteri isolati nei diversi ascomi e valutarne le similitudini.

## **3.7. ANALISI STATISTICA DEI DATI**

Tutte le analisi statistiche dei dati presentate in questo lavoro sono state eseguite utilizzando il software MiniTab®. Attraverso la funzione *General Linear Model* si è svolta l'analisi Anova ( $P < 0,05$ ) e la *Bonferroni Pairwise Comparisons* (95% Confidence). Inoltre, si è valutato il grado di similitudine delle diverse colonie estratte con l'utilizzo della funzione di statistica multivariata, in particolare la *Cluster Analysis*.

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1. ANALISI CHIMICHE DEI CAMPIONI DI SUOLO

I due suoli forestali in esame mostrano un diverso grado di pH. Il suolo del sito SAG presenta una reazione subacida ( $\text{pH } 5,73 \pm 0,23$ ) mentre quella del sito LSF è decisamente basica ( $\text{pH } 8,03 \pm 0,27$ ).

L'analisi granulometrica (Fig. 7) indica un'effettiva differenza della tessitura dei due suoli. Il suolo del sito SAG mostra un'importante componente in sabbia (60%), rientrando, per la catalogazione della società internazionale di scienze del suolo, nella categoria *Sabbioso-Limoso*. Si caratterizza quindi per l'elevato drenaggio, forte ossigenazione e forte tendenza alla lisciviazione delle sostanze nutritive (Ferrarotti, 1997). Il suolo del sito LSF presenta una grande componente limosa (63%) e può essere classificato come *Limoso*. Le sue caratteristiche generali sono la bassa malleabilità, ridotta permeabilità e può presentare fenomeni di erosione e compattamento.

Inoltre, per entrambi i suoli si rileva una ridottissima frazione argillosa.

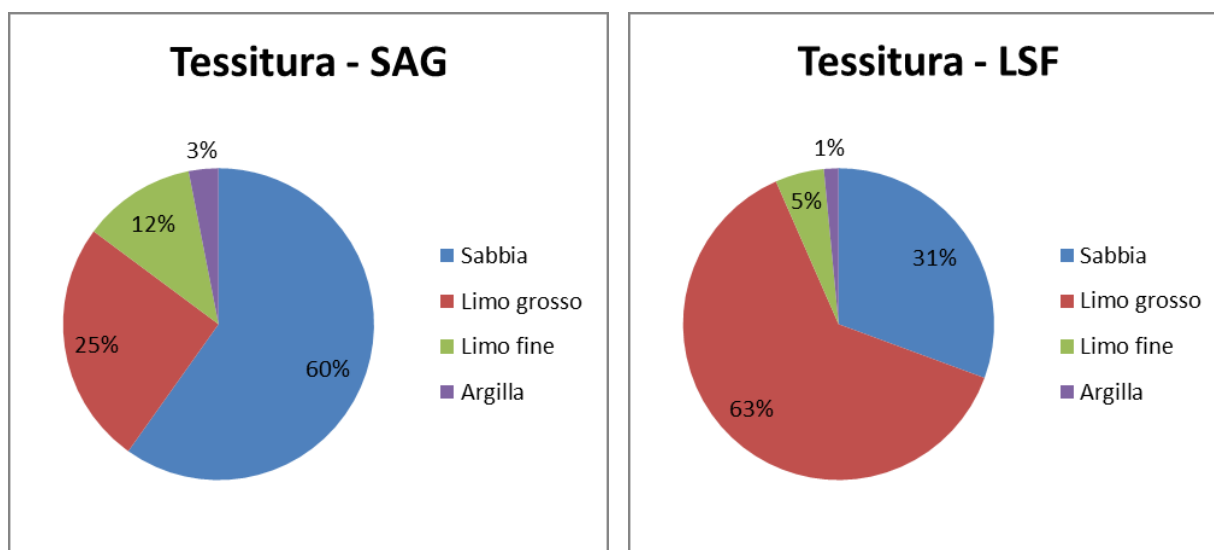
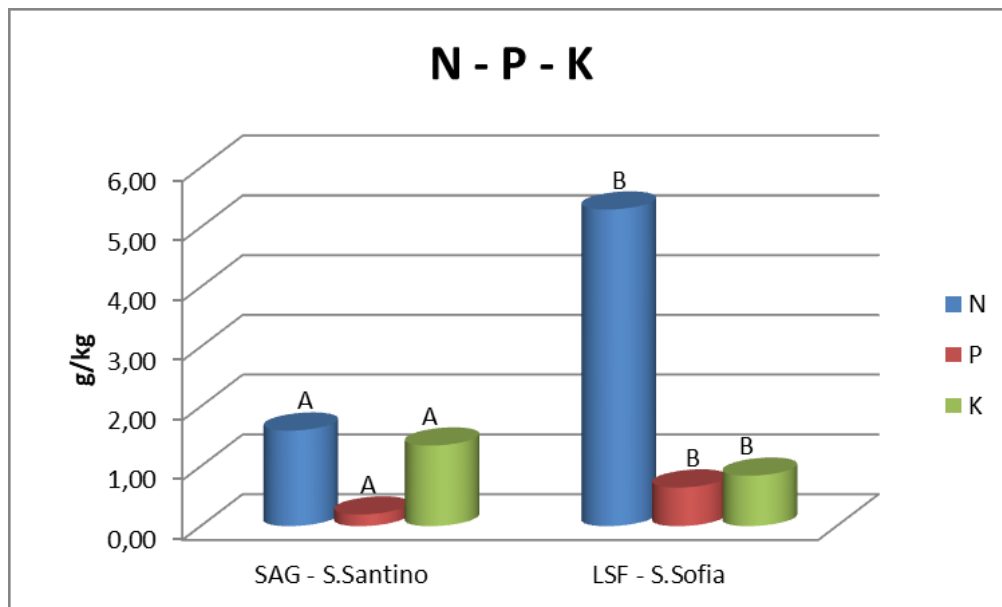


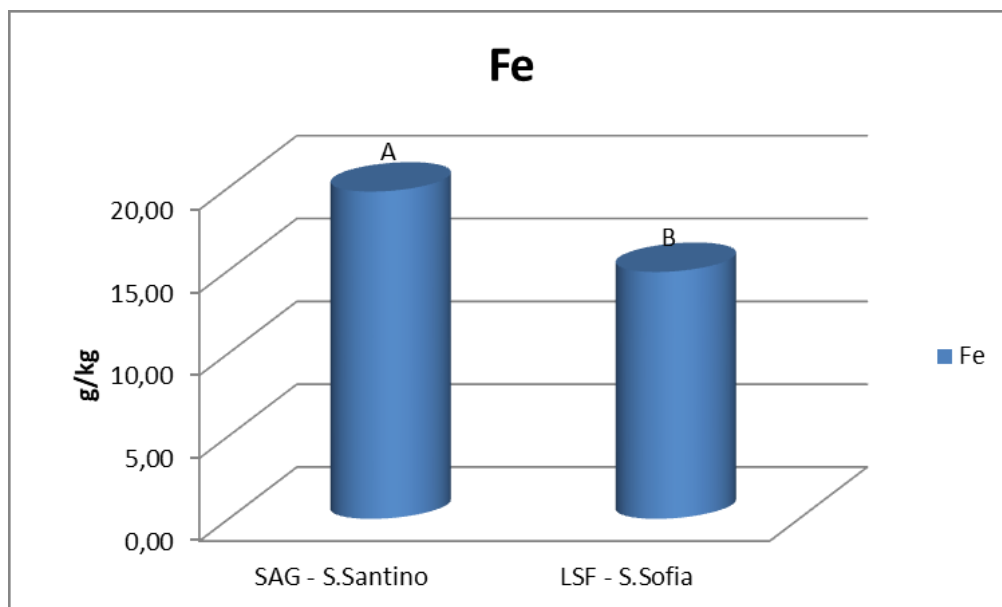
Figura 7: Analisi granulometrica dei suoli tartufigeni

I suoli dei due siti si differenziano anche per il contenuto in macronutrienti (Fig. 8). Il sito SAG mostra una buona dotazione di azoto e potassio, mentre il quantitativo di fosforo è ridotto. Nel sito LSF si rileva un'elevata concentrazione di azoto e complessivamente buoni valori di fosforo e potassio.



**Figura 8: Dotazione di macronutrienti**

Per quanto concerne la dotazione in ferro, i due suoli oggetto di analisi mostrano differenti valori medi pari a 19,75 g/kg nel sito SAG e 14,90 g/kg in nel sito LSF (Fig. 9).



**Figura 9: Dotazione in ferro**

La determinazione del contenuto in calcare attivo e calcare totale risulta differente per i due siti (Fig. 10): nel sito LSF sono stati rilevati rispettivamente  $8,75 \pm 0,48$  g/kg e  $539,25 \pm 62,72$  g/kg, mentre nel sito SAG entrambi i parametri sono sotto la soglia minima di rilevamento per la metodica utilizzata.

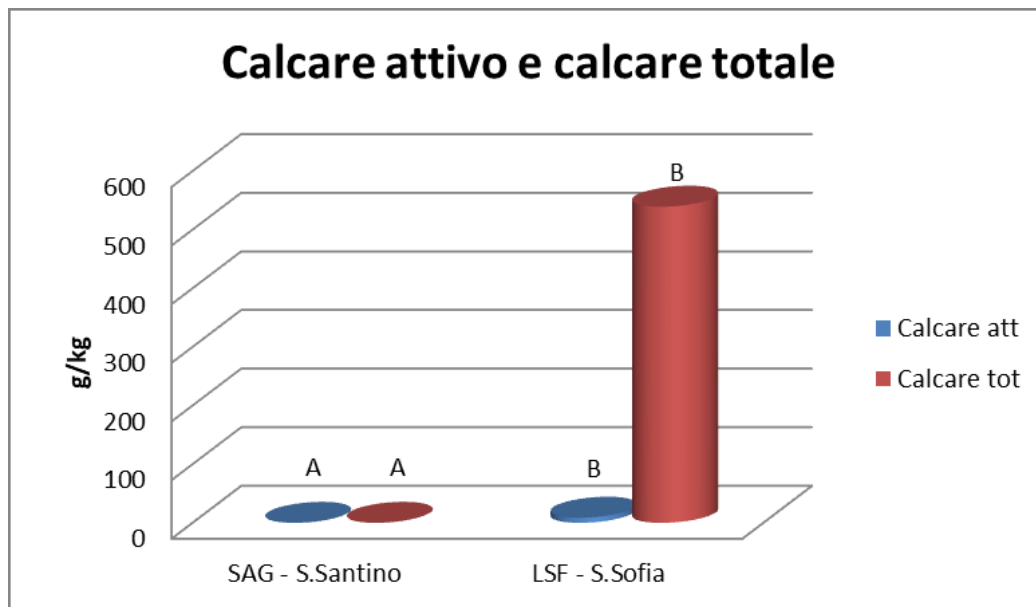


Figura 10: Dotazione in calcare attivo e calcare totale

I valori di conducibilità elettrica riscontrati nei due siti, benché diversi tra loro, delineano una ridotta salinità nella soluzione circolante del suolo (Fig. 11).

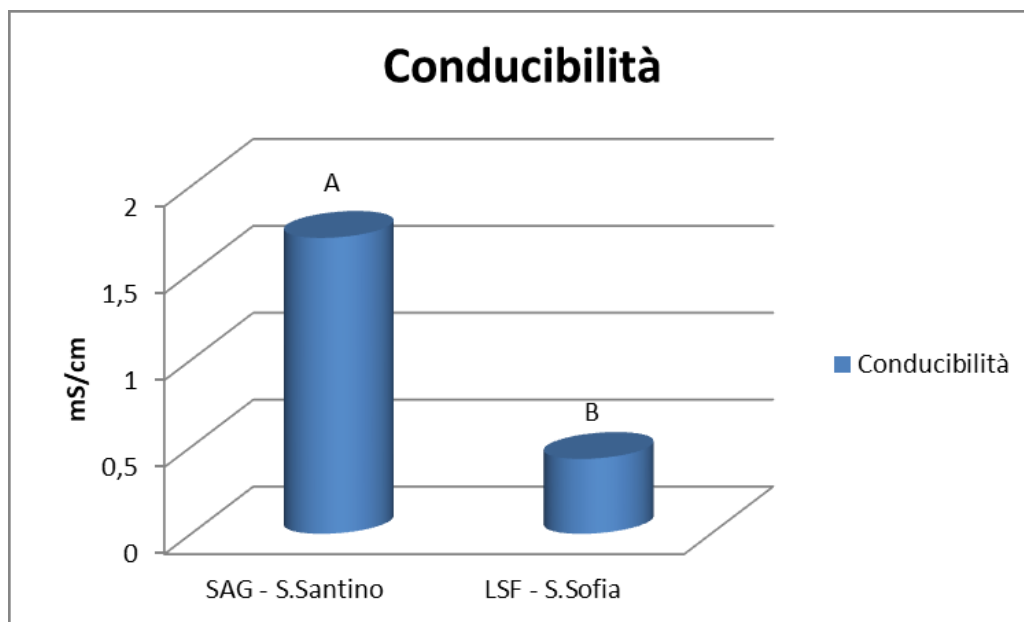


Figura 11: Valori di conducibilità elettrica

La capacità di scambio cationico risulta differente nei due siti: in SAG si rileva un valore medio di  $8,50 \pm 0,115 \text{ mS/cm}^2$ , mentre nel sito LSF il valore si attesta sui  $40,40 \pm 2,985 \text{ mS/cm}^2$  (Fig. 12).

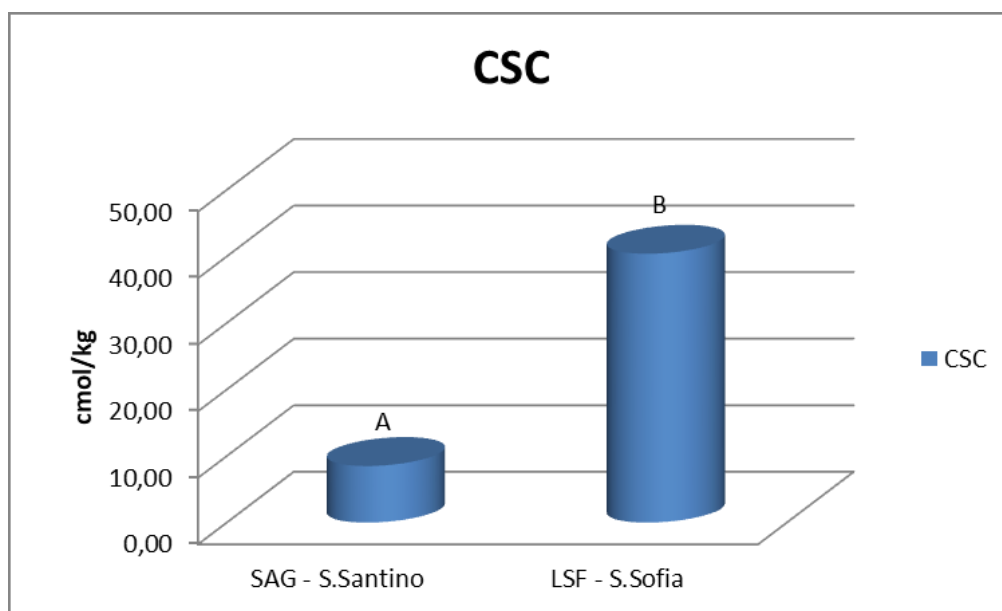


Figura 12: Capacità di scambio cationico (CSC)

A differenza di tutti gli altri parametri fisico-chimici rilevati nel suolo dei due siti, quelli relativi al contenuto in sostanza organica, espressi come carbonio organico estraibile (TEC) e sostanze umiche (HA+FA), non mostrano differenze statisticamente significative (Fig. 13).

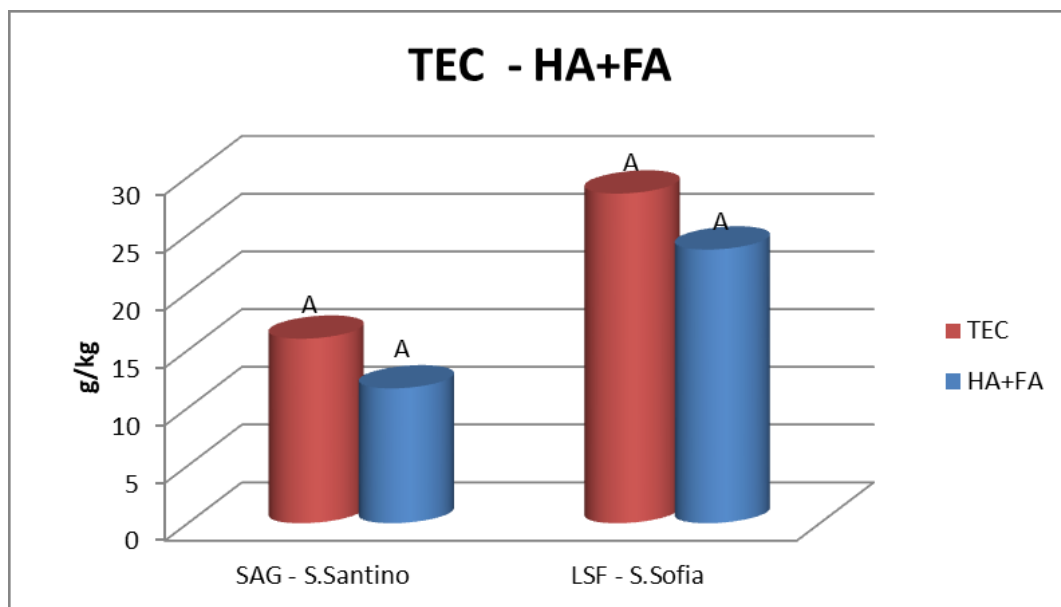


Figura 13: Quantità in humus e delle sue frazioni fulviche e umiche

Per i campioni di suolo del sito SAG, l'indice (HI%) e il grado di umificazione (DH%) rilevati sono rispettivamente di  $37\% \pm 5\%$  e  $73\% \pm 16\%$  nel sito SAG, mentre per i campioni del sito LSF sono pari al  $20\% \pm 9\%$  e  $83\% \pm 7\%$ . Dai dati si deduce che nel sito LSF, rispetto al sito SAG, prevalgono i processi di umificazione.

Il rapporto carbonio azoto nel sito SAG è compreso tra 9 e 11, mentre nel sito LSF ha un valore medio inferiore a 9. Nel primo caso i valori rilevati dimostrano una corretta evoluzione della sostanza organica, mentre nel secondo caso indicano una rapida degradazione dei composti carboniosi che può ostacolare la formazione di sostanze umiche stabili (Fig. 14).

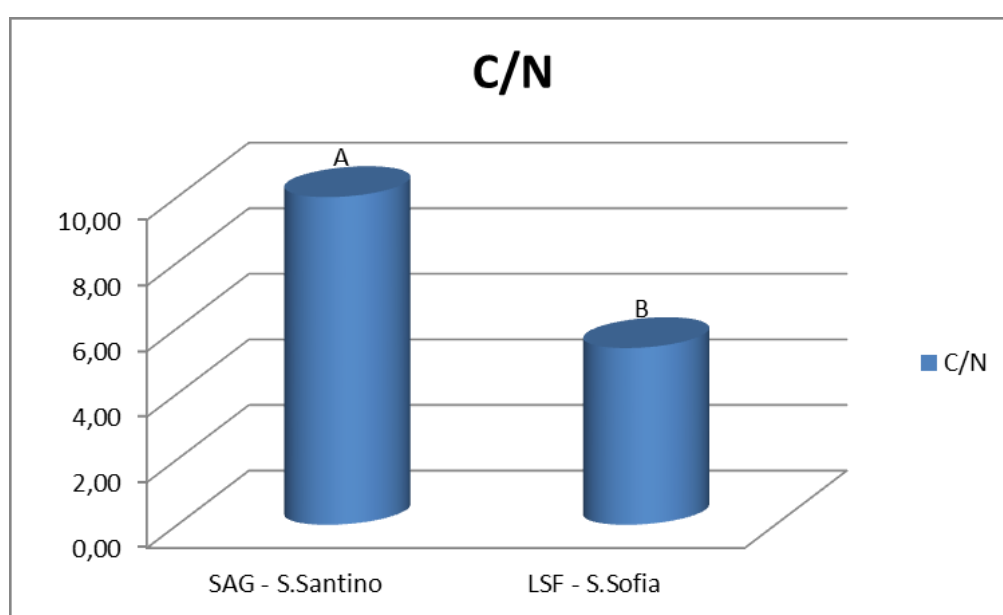


Figura 14: Rapporto carbonio/azoto

## 4.2. CARICA MICROBICA DELLE DIVERSE COMUNITÀ

Le conte microbiche totali dei campioni di suolo e di ascoma, rilevate dopo 48 e 96 ore di incubazione (Tab. 5), mostrano una generale omogeneità dimensionale delle comunità, con valori prossimi a  $10^7$  ufc/g. Tuttavia l'analisi statistica dei dati rileva che, sia alle 48 sia alle 96 ore, i campioni del peridio provenienti da entrambi i siti (GAP e CAP) si differenziano dagli altri per una carica microbica maggiore e dell'ordine di  $10^8$  ufc/g (Fig. 15).

Tabella 5: Valori delle conte microbiche totali

| Campione   | Conte microbiche totali (ufc/g) |                        |                    |                        |
|------------|---------------------------------|------------------------|--------------------|------------------------|
|            | 48 h                            |                        | 96 h               |                        |
| <b>GSA</b> | $8,89 \times 10^7$              | $\pm 5,33 \times 10^7$ | $1,01 \times 10^8$ | $\pm 6,28 \times 10^7$ |
| <b>CSA</b> | $1,70 \times 10^7$              | $\pm 6,39 \times 10^6$ | $4,01 \times 10^7$ | $\pm 3,00 \times 10^7$ |
| <b>GSB</b> | $6,17 \times 10^6$              | $\pm 4,10 \times 10^6$ | $9,50 \times 10^6$ | $\pm 5,51 \times 10^6$ |
| <b>CSB</b> | $1,42 \times 10^7$              | $\pm 7,53 \times 10^6$ | $2,69 \times 10^7$ | $\pm 1,44 \times 10^7$ |
| <b>GAP</b> | $1,64 \times 10^8$              | $\pm 2,01 \times 10^8$ | $5,38 \times 10^8$ | $\pm 4,86 \times 10^8$ |
| <b>CAP</b> | $1,68 \times 10^8$              | $\pm 1,63 \times 10^8$ | $4,75 \times 10^8$ | $\pm 6,53 \times 10^8$ |
| <b>GAG</b> | $1,11 \times 10^6$              | $\pm 9,85 \times 10^5$ | $1,30 \times 10^7$ | $\pm 2,08 \times 10^7$ |
| <b>CAG</b> | $1,03 \times 10^7$              | $\pm 8,19 \times 10^6$ | $4,20 \times 10^7$ | $\pm 4,54 \times 10^7$ |

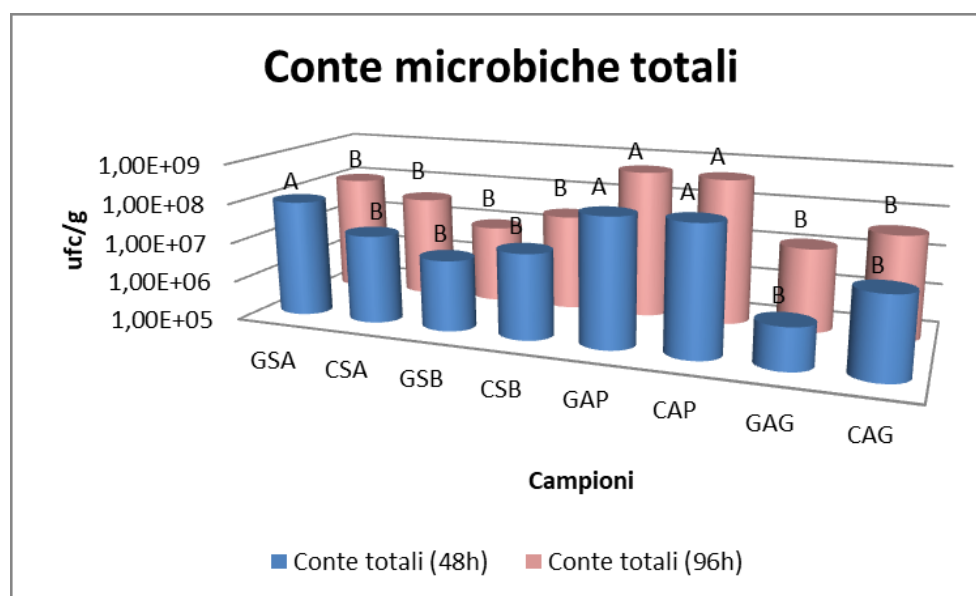


Figura 15: Valori delle conte microbiche totali



### 4.3. ANALISI CLPP DELLA COMUNITÀ MICROBICA DEL SUOLO

Dall'esame della figura 16 inerente l'attività metabolica complessiva delle comunità microbiche estratte dai due siti d'indagine, si evince che non vi sono differenze statisticamente rilevanti.

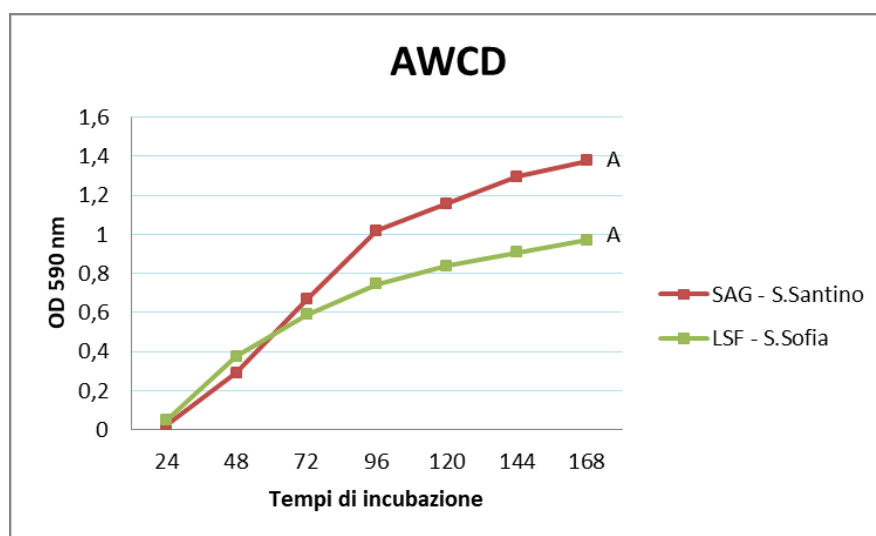


Figura 16: Grafico dell'attività metabolica complessiva (AWCD)

L'indice di Shannon (Fig.17), calcolato sia sulla base del numero di substrati utilizzati, sia del loro diverso grado di utilizzazione, rivela una certa biodiversità soltanto durante le prime ore di incubazione delle Ecoplate™ probabilmente legata ad una maggiore presenza di microrganismi zimogeni.

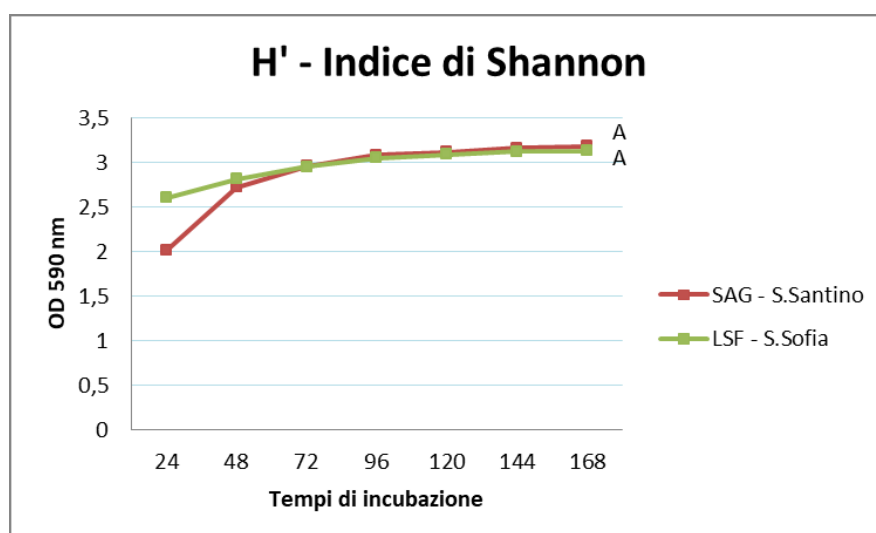


Figura 17: Biodiversità microbica - indice di Shannon

La *Richness* (Fig.18), calcolata sul numero dei substrati utilizzati nell'unità di tempo, conferma quanto visto in precedenza, evidenziando che le comunità microbiche dei due suoli utilizzano lo stesso numero di substrati nella stessa unità di tempo.

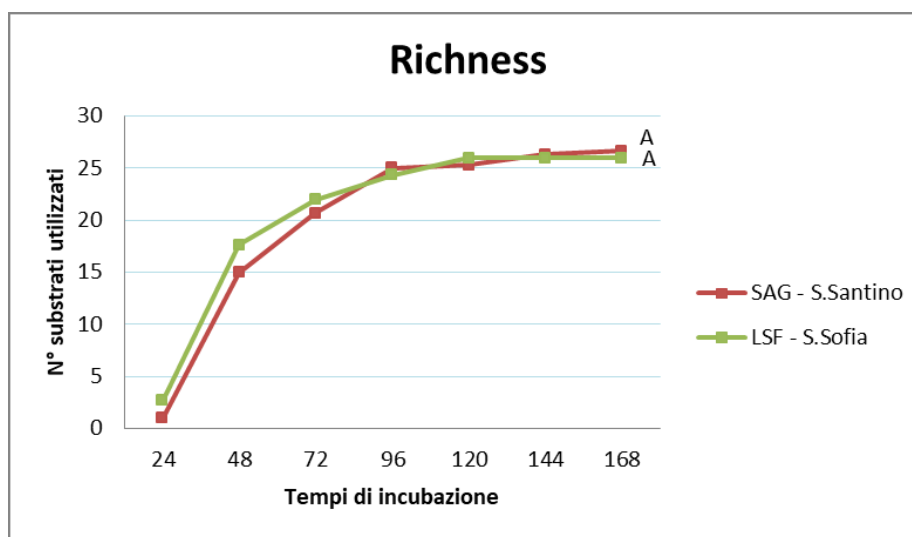


Figura 18: Biodiversità microbica - Richness

L'utilizzo specifico delle fonti di carbonio (Fig. 19), evidenzia che, alle 72 ore di incubazione, le due comunità microbiche catabolizzano in modo differente 3 gruppi di substrati: zuccheri e zuccheri derivati, zuccheri fosfati, e aminoacidi. Nel suolo calcareo si registra una maggiore attività fermentativa forse legata alla presenza di microrganismi zimogeni; nel suolo granitico vengono maggiormente consumati gli aminoacidi.

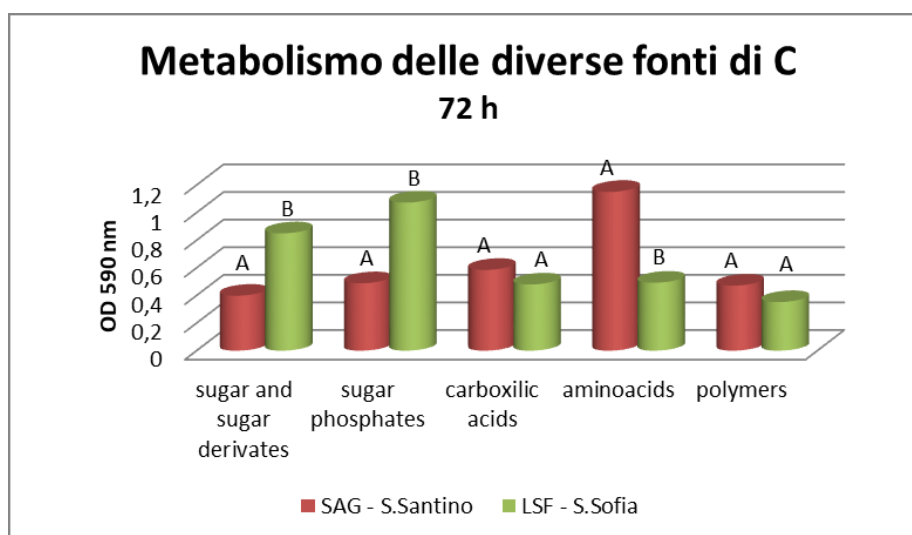
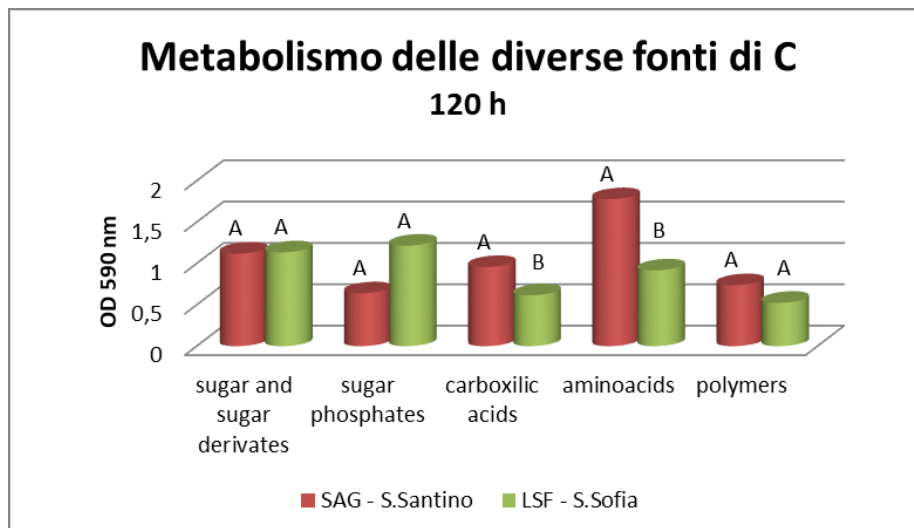


Figura 19: Utilizzo di fonti di carbonio – 72 h di incubazione

Dopo 120 ore di incubazione le due comunità microbiche si equivalgono nel consumo degli zuccheri; rimangono differenze significative nella utilizzazione degli aminoacidi e degli acidi carbossilici nel sito SAG (Fig. 20). Le altre differenze, elencate precedentemente rimangono valide e costanti in entrambi i tempi di incubazione rilevati.



**Figura 20: Utilizzo di fonti di carbonio – 120 h di incubazione**

#### 4.4. IDENTIFICAZIONE GENETICA DEI BATTERI DEL SUOLO

Dei 184 isolati batterici avviati ad identificazione tramite sequenziamento del rRNA della regione 16S ribosomiale (Cap. 3.5), il 70% è stato ritrovato nel database RDP. I risultati ottenuti delle sequenze genomiche per GSB, CSB, GSA e CSA sono stati rispettivamente del 68%, 67%, 64% e 81%.

Dall'analisi dei dati rilevata si è osservato che la comunità batterica del suolo forestale del sito LSF è composta principalmente dalle seguenti classi: *Bacilli* (34,38%), *Actinobacteria* (18,75%), *Alphaproteobacteria* (15,63%), *Betaproteobacteria* (15,63%), *Gammaproteobacteria* (6,25%), *Flavobacteriia* (6,25%), e *Cytophagia* (3,13%). La famiglia più rappresentata è quella delle *Bacillaceae* con il 31% degli isolati identificati (Fig. 21).

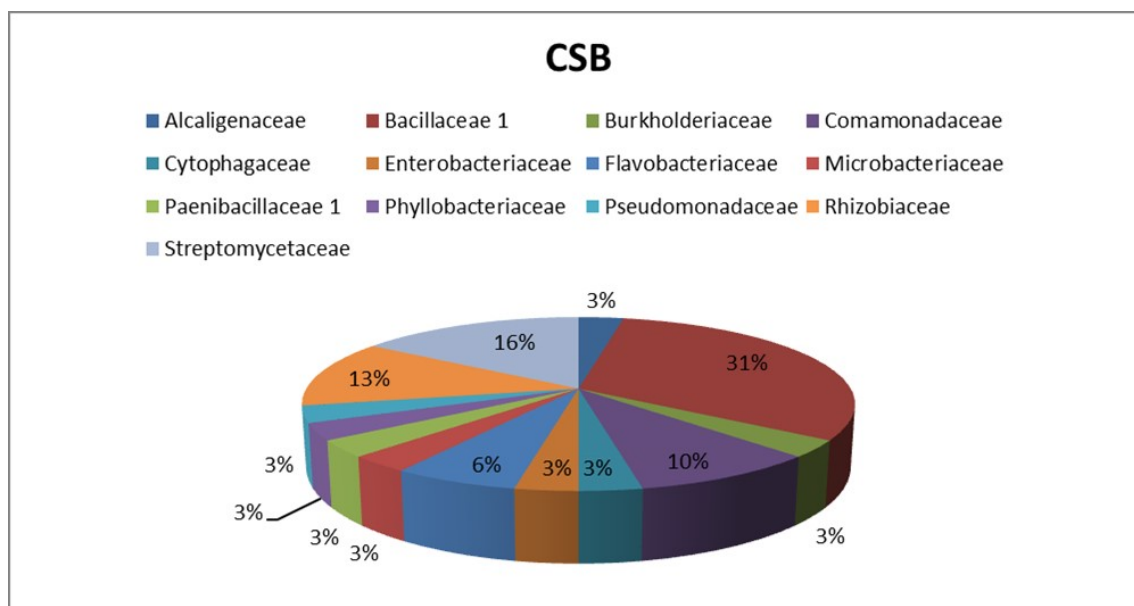
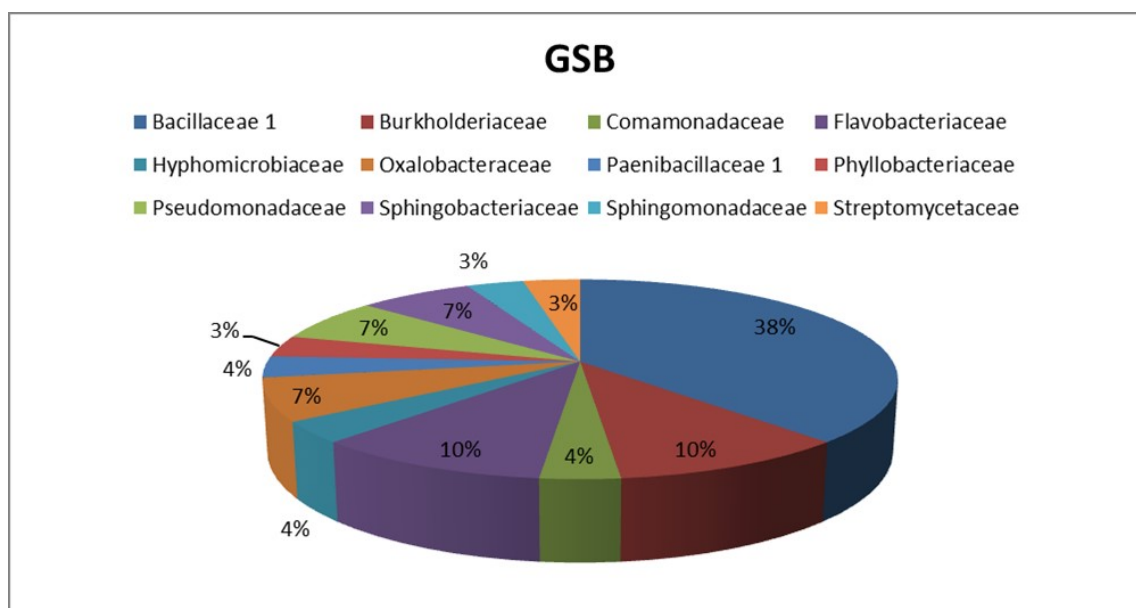


Figura 21: Famiglie batteriche rilevate in *Calcareous Soil Bulk* (CSB)

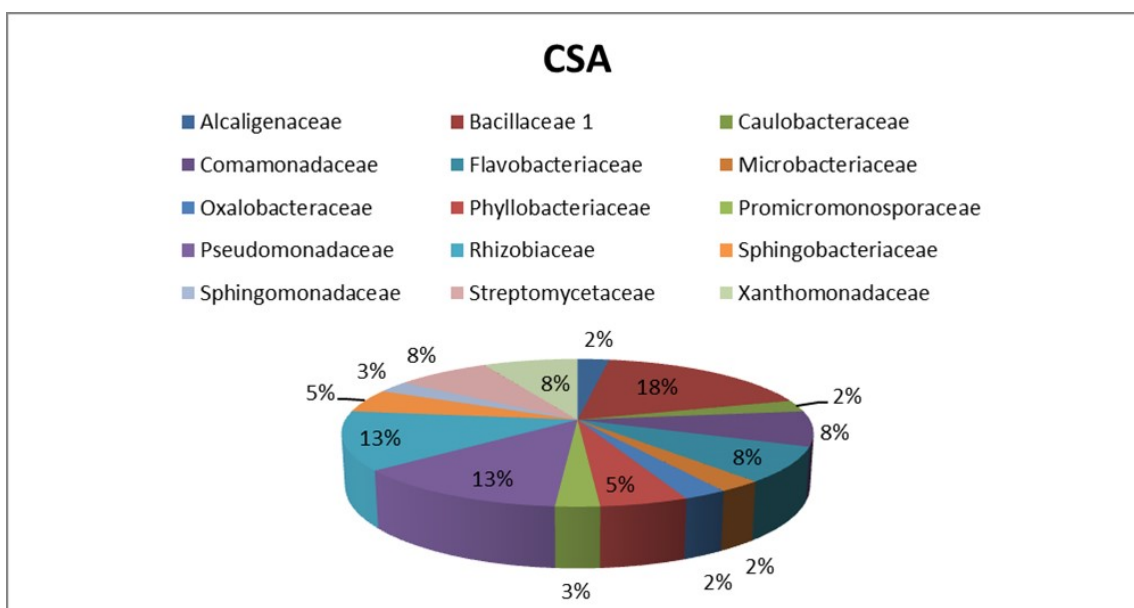
La comunità batterica del suolo forestale del sito SAG mostra invece una diversa composizione. Le classi rilevate sono: *Bacilli* (41,38%), *Betaproteobacteria* (20,69%), *Alphaproteobacteria* (10,34%), *Flavobacteriia* (10,34%), *Gammaproteobacteria* (6,90%), *Sphingobacteriia* (6,90%) e *Actinobacteria* (3,45%). Nessun isolato è risultato appartenere alla classe dei *Cytophagia* non è stato rilevato come invece è avvenuto in precedenza. Anche in questo caso, la famiglia più abbondante è quella delle *Bacillaceae* con il 38% (Fig. 22).



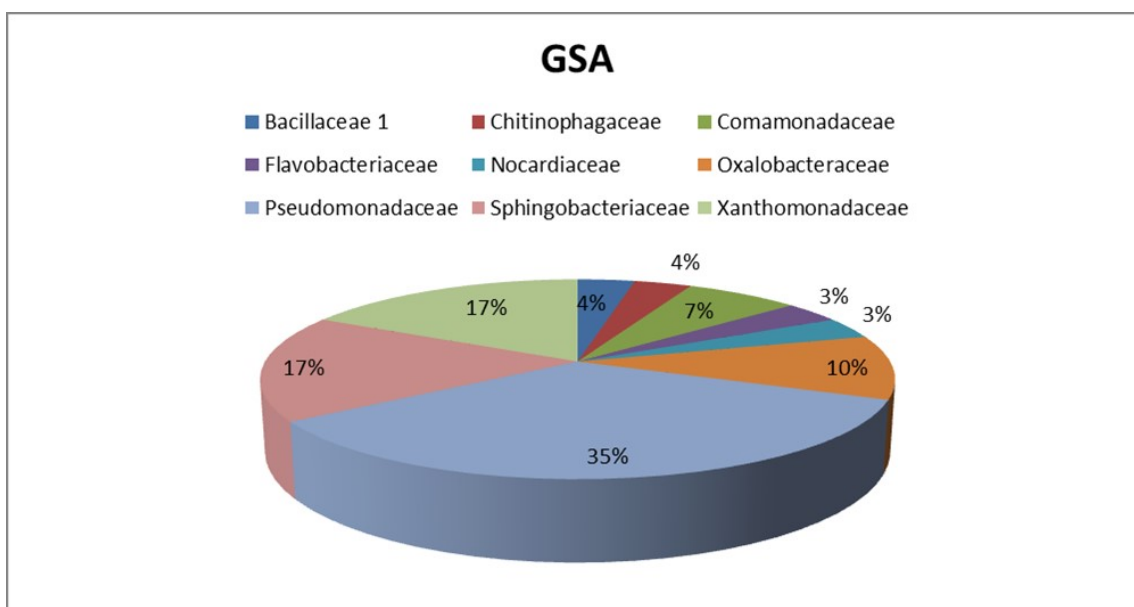
**Figura 22: Famiglie batteriche rilevate in Granitic Soil Bulk (GSB)**

Il suolo ascomico, (*Calcareous Soil Ascocarp*) campionato dagli ascomi del sito LSF mostra una comunità batterica dominata dalla classe dei *Alphaproteobacteria* (23,08%), seguiti nell'ordine da: *Gammaproteobacteria* (20,51%), *Bacilli* (17,95%), *Actinobacteria* (12,82%), *Betaproteobacteria* (12,82%), *Flavobacteriia* (7,69%). Rimarchevole la presenza di isolati appartenenti alla classe dei *Sphingobacteriia* (5,13%), non rilevati nel suolo forestale dello stesso sito. Anche in questo caso, la famiglia più rappresentata è quella delle *Bacillaceae* con il 18%, seguita dalle *Pseudomonadaceae* (13%) e dalle *Flavobacteriaceae* (13%) (Fig. 23).

Diversamente, la comunità batterica del suolo ascomico, (*Granitic Soil Ascocarp*) ottenuta dai campioni fungini del sito SAG mostra la seguente composizione: *Gammaproteobacteria* (51,72%), *Bacilli* (3,45%), *Actinobacteria* (3,45%), *Betaproteobacteria* (17,24%), *Flavobacteriia* (3,45%) e *Sphingobacteriia* (20,69%). Sorprendentemente non sono stati rilevati batteri appartenenti agli *Alphaproteobacteria*, presenti in quantità non trascurabile nel relativo suolo forestale. Nel suolo ascomico del sito SAG la famiglia più rappresentata è quella delle *Pseudomonadaceae* con ben il 35% degli isolati, seguita dalle *Xanthomonadaceae* (17%) e dalle *Sphingobacteriaceae* (17%) (Fig. 24).



**Figura 23: Famiglie batteriche rilevate in *Calcareous Soil Ascocarp* (CSA)**

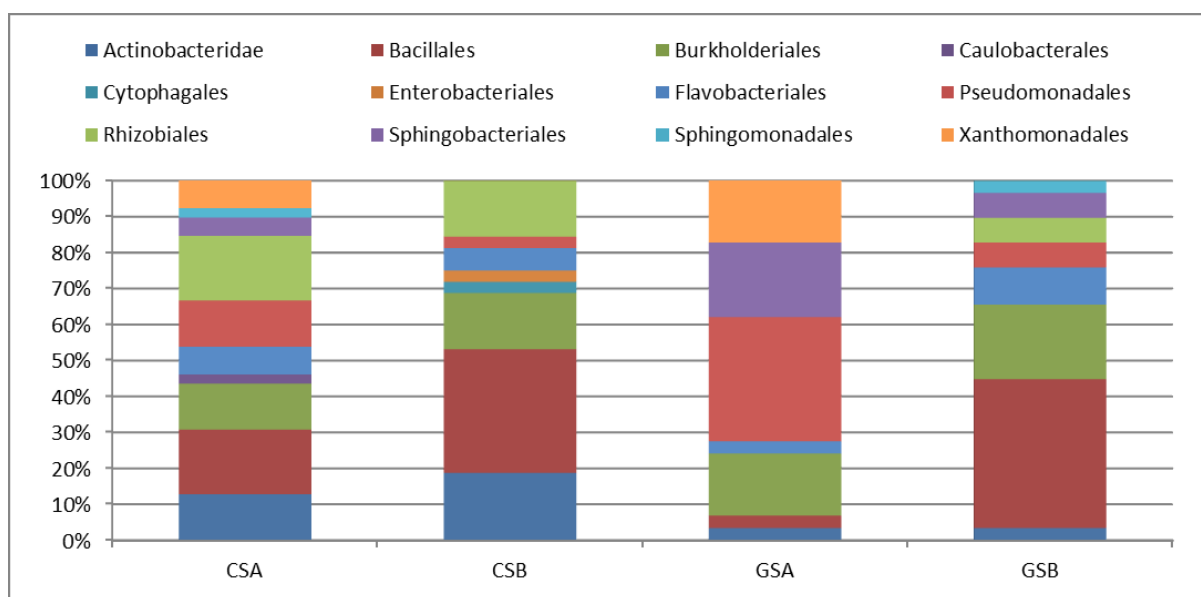


**Figura 24: Famiglie batteriche rilevate in *Granitic Soil Ascocarp* (GSA)**

Dall'osservazione comparata delle comunità batteriche estratte dalle quattro tipologie di suolo, si rileva che esse sono differenti per composizione.

Difatti, mentre nelle comunità estratte dai campioni CSB e GSB si osserva la dominanza dell'ordine dei *Bacillales*, rispettivamente 34,48% e 41,38%, nei due suoli ascomici tale caratteristica non viene mantenuta: nella comunità batterica del CSA l'ordine dei *Bacillales* assume la stessa rilevanza dei *Rhizobiales* (17,95%), nella comunità batterica

dei campioni GSA dominano i *Pseudomonadales* e i *Xanthomonadales*, con un peso rispettivamente del 34,48% e del 17,24% (Fig. 25).



**Figura 25: Confronto delle comunità microbiche delle diverse tipologie di suolo**

Dalle analisi dei dati è emerso inoltre che nei campioni CSB non è stata osservata la presenza di isolati batterici riconducibili agli ordini dei *Sphingobacteriales* e *Sphingomonadales*, presenti invece nei campioni GSB, che risultano tuttavia mancare di *Caulobacteriales*, *Cytophagales* ed *Enterobacteriales*. Di particolare interesse inoltre è la presenza dell'ordine dei *Xanthomonadales* esclusivamente nei campioni di suolo ascomico dei due siti (CSA e GSA) ma assente nei rispettivi suoli di appartenenza (CSB e GSB).

Peraltro, l'ordine dei *Caulobacteriales* è stato rilevato esclusivamente nel suolo ascomico CSA, così come quello dei *Cytophagales* e quello degli *Enterobacteriales* è risultato presente esclusivamente nel campione del suolo forestale CSB. L'ordine dei *Sphingobacteriales* è risultato assente in CSA, mentre quello degli *Sphingomonadales* è presente in CSA e GSB. Si rileva inoltre che nella comunità batterica estratta dai campioni GSA manca totalmente di *Rhizobiales*.

#### 4.5. IDENTIFICAZIONE METABOLICA DEI BATTERI LEGATI AL *T. BORCHII*

Il grafico in figura 26 riporta i risultati delle analisi di identificazione metabolica eseguite sui 36 isolati delle comunità batteriche associate agli ascomi campionati nei due siti di indagine, rilevando separatamente gli isolati del peridio e della gleba di tutti gli ascomi. Dai risultati è possibile osservare che la famiglia delle *Pseudomonadaceae* risulta predominante nel peridio di tutti gli ascomi – 85% in CAP e 50% in GAP. Inoltre la presenza di *Comamonadaceae* è rilevata esclusivamente nei campioni prelevati nel sito LSF.

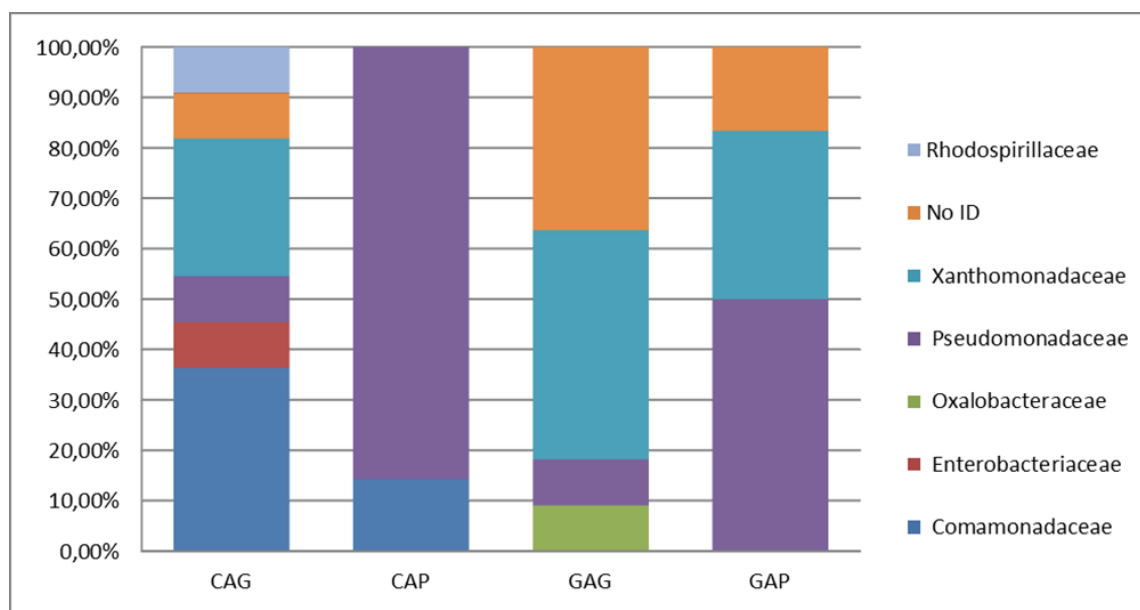


Figura 26: Grafico di confronto tra le comunità microbiche dei diversi ascomi

L'elenco completo degli isolati analizzati con le piastre GEN III<sup>®</sup> è riportato nella seguente tabella (Tab. 6).

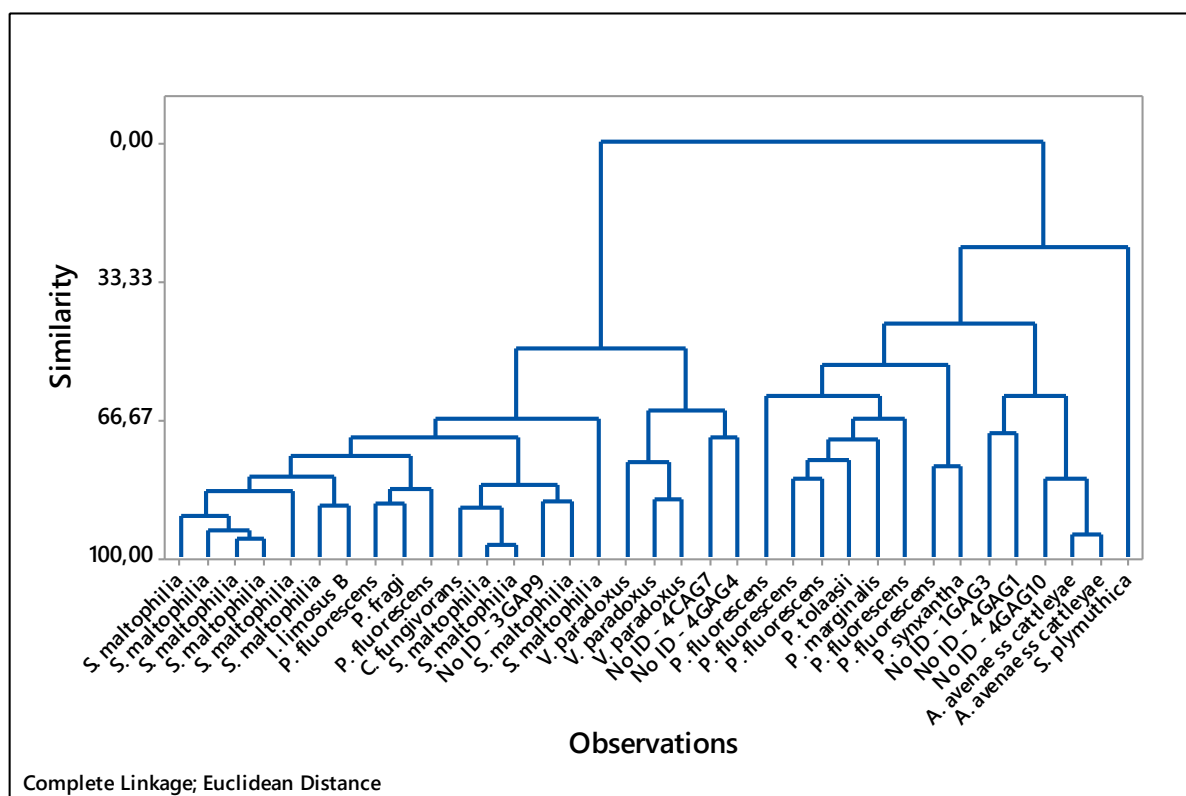
Tra i diversi ceppi isolati negli ascomi, la presenza di *Stenotrophomonas maltophilia* è stata rilevata sui campioni CAG GAG e GAP, mentre la specie *Variovorax paradoxus* è stata rilevata nei campioni CAG e CAP.

Il 17,14% degli isolati batterici, pur ottenendo un buon profilo metabolico delle piastre GEN III<sup>®</sup>, non ha avuto alcun riscontro nel database ODC<sup>®</sup>. Tuttavia l'analisi dei cluster mostra significative similitudini con alcuni ceppi batterici identificati (Fig.27).



**Tabella 6: Batteri identificati metabolicamente con tecnologia Biolog GEN III®**

| Provenienza                                       | Identità dell'isolato                        | Frequenza di rilevamento |
|---|--|--------------------------|
| <b>CAG</b><br><br>31,43% sul totale degli isolati | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>          | 27,27%                   |
|   | <i>Acidovorax avenae</i> ss <i>cattleyae</i> | 18,18%                   |
|   | <i>Variovorax paradoxus</i>                  | 18,18%                   |
|   | <i>Pseudomonas tolaasii</i>                  | 9,09%                    |
|   | <i>Serratia plymuthica</i>                   | 9,09%                    |
|   | <i>Inquilinus limosus</i> B                  | 9,09%                    |
|   | No ID  | 9,09%                    |
| <b>CAP</b><br><br>20,00% sul totale degli isolati | <i>Pseudomonas fluorescens</i>               | 85,71%                   |
|   | <i>Variovorax paradoxus</i>                  | 14,29%                   |
| <b>GAG</b><br><br>31,43% sul totale degli isolati | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>          | 45,45%                   |
|   | <i>Collimonas fungivorans</i>                | 9,09%                    |
|   | <i>Pseudomonas synxantha</i>                 | 9,09%                    |
|   | No ID  | 36,36%                   |
| <b>GAP</b><br><br>17,14% sul totale degli isolati | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>          | 33,33%                   |
|   | <i>Pseudomonas fluorescens</i>               | 16,67%                   |
|   | <i>Pseudomonas fragi</i>                     | 16,67%                   |
|   | <i>Pseudomonas marginalis</i>                | 16,67%                   |
|   | No ID  | 16,67%                   |



**Figura 27: Analisi dei cluster dei profili metabolici delle specie identificate**

DR. GIOVANNI RAGAGLIA – Studi sulla diversità della comunità batterica associata alla simbiosi ectomicorrizica tra *Tuber borchii* e *Quercus ilex* in differenti ecosistemi forestali della Sardegna

Università degli Studi di Sassari – Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie

Curriculum: Monitoraggio e controllo degli ecosistemi agrari e forestali in ambiente mediterraneo – XXX ciclo

#### 4.5.1. Analisi metabolica dei profili medi

L'analisi dei cluster eseguita sui profili medi degli isolati batterici, infeudati nelle diverse porzioni dell'ascoma, ha evidenziato un buon grado di similitudine tra i campioni di gleba (GAG e CAG), mentre ha staccato il profilo medio GAP (Fig. 28).

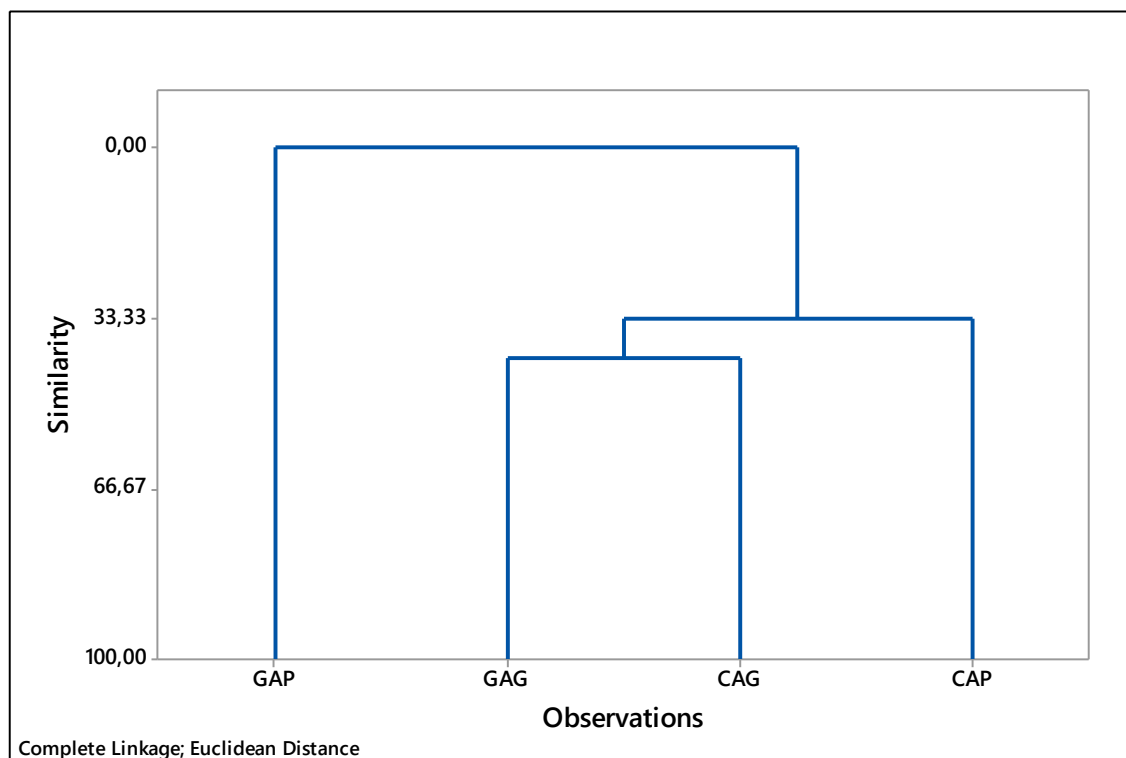


Figura 28: Analisi dei cluster dei profili metabolici medi degli isolati batterici

Inoltre, raggruppando per tipologia i diversi substrati proposti nelle piastre GEN III® è stato osservato che gli acidi esosi sono i composti chimici maggiormente utilizzati da tutti i profili degli isolati batterici mentre gli zuccheri e i loro derivati sono i meno utilizzati (Fig.29). Questo sta a dimostrare che in linea di massima, la comunità batterica associata agli ascomi del *T.borchii* è stabile, con una strategia di sviluppo di tipo “k”, dimostrando di saper degradare in modo efficiente composti organici complessi.

Come già evidenziato dall'analisi dei cluster, il profilo medio osservato per GAP mostra un ridotto utilizzo dei substrati proposti rispetto agli altri profili, fatta eccezione per gli acidi esosi.

Tuttavia, l'analisi dei cluster sui singoli substrati proposti non ha evidenziato raggruppamenti significativi né per la provenienza dell'isolato batterico, né per la specie identificata.

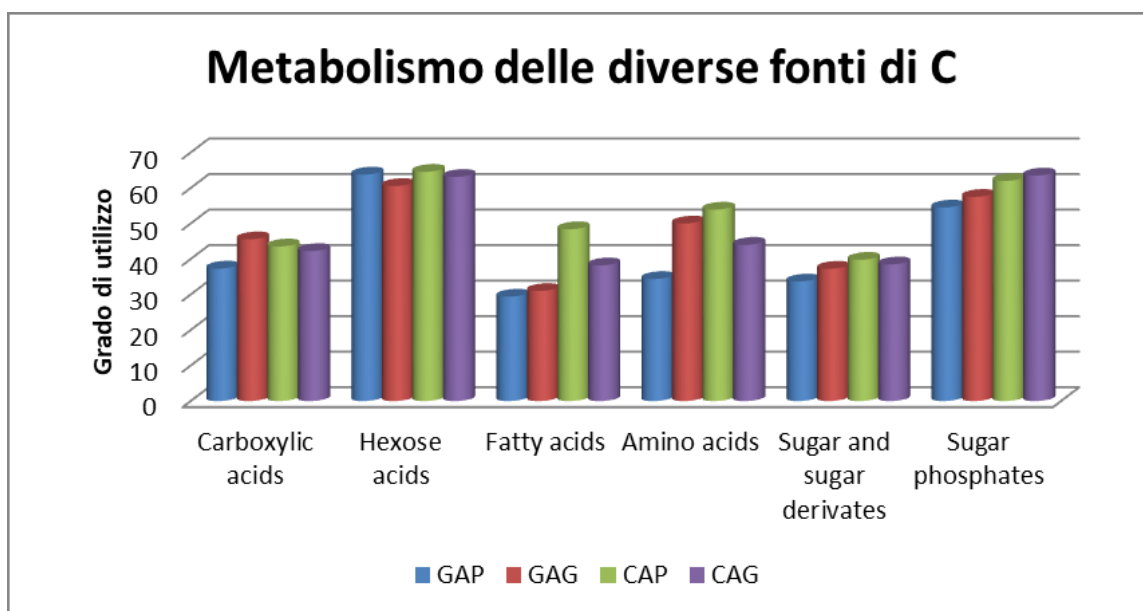


Figura 29: Metabolismo delle diverse fonti di carbonio riferito ai profili medi

#### 4.5.2 Descrizione delle specie identificate

*Acidovorax avenae* ss *cattleyae*, è un  $\beta$ -proteobatterio Gram-negativo della famiglia delle *Comamonadaceae*. Originariamente descritto nel 1909 come *Pseudomonas avenae*, patogeno fogliare e dei germogli di *Avena sativa* L., ne è stato proposto il trasferimento al nuovo genere *Acidovorax* nel 1990 (Willems *et al.*, 1990). Nel 2008 sulla base di nuove prove genetiche è stato riclassificato come *Acidovorax cattleyae* (Schaad *et al.*, 2008). Agente patogeno di numerose specie della famiglia delle *Graminaceae*, causa danni soprattutto in condizioni di precipitazioni elevate ed alte temperature. Altre pathovar di *A. avenae* sono agenti di malattia in colture intensive come anguria, melone (*Acidovorax citrulli*) e riso (*Acidovorax oryzae*).

*Collimonas fungivorans* è un  $\beta$ -proteobatterio della famiglia delle *Oxalobacteraceae* che oltre a mostrare attività fungicida (Kamilova *et al.*, 2007), è capace di crescere su ife viventi di diversi funghi (De Boer *et al.*, 2001, 2004). Gram-negativo con attività catalasica negativa, ha la particolarità di degradare la chitina (De Boer *et al.*, 1999).

*Inquilius limosus B* è un  $\alpha$ -proteobatterio della famiglia delle *Rhodospirillaceae*. Si tratta di un batterio Gram-negativo, aerobio, chemio-organotrofo, non-mobile, asporigeno, di forma bastoncellare. Isolato nelle secrezioni respiratorie di pazienti affetti da fibrosi cistica (Coenye 2002) è stato rinvenuto nel 2011 in un campo agrario in cui era in atto una coltivazione di ginseng. Questa sua variante ambientale è stata elevata al rango di specie col nome di *Inquilius ginsengisoli* (Jung *et al.*, 2011).

*Pseudomonas fluorescens* è una specie ubiquitaria a forma di bastoncello con flagelli multipli, appartenente ai  $\gamma$ -proteobatteri. Gram-negativo, ossidasi-positivo, non saccarolitico, produce lipasi e proteasi termostabili. Tra i diversi ceppi appartenenti a questa specie si trovano PGPR (Saravanakumar, *et al.*, 2007; Stover *et al.*, 2000), MHB (Duponnois *et al.*, 1991), e patogeni umani (Hsueh *et al.*, 1998). Alcune varianti hanno mostrato anche la capacità di produrre mupirocina (El-Sayed *et al.*, 2003), antibiotico attivo su Gram-positivi (Stafilococchi e Streptococchi), alcuni Gram negativi e con azione antimicotica nei confronti della *Candida* (Neuman *et al.*, 1987). Come altri *Pseudomonas* ha la capacità di produrre siderofori (Zhao *et al.*, 2006). Alcuni ceppi MBH di *P. fluorescens*, in carenza di ferro variano il proprio habitus ed entrano in competizione col fungo ectomicorrizico *Laccaria bicolor* (Deveau *et al.*, 2016). Lo stesso comportamento è stato osservato anche nei confronti del batterio *Streptomyces ambofaciens* (Galet *et al.*, 2015).

*Pseudomonas fragi* un  $\gamma$ -proteobatterio psicrofilico della famiglia delle *Pseudomonadaceae*, Gram-negativo ubiquitario è conosciuto per essere implicato nel deterioramento di prodotti lattiero-caseari (aroma fruttato) (Pereira e Morgan, 1957). A differenza di molti altri membri del genere *Pseudomonas*, *P. fragi* non produce siderofori (Champomier-Vergès *et al.*, 1996).

*Pseudomonas marginalis* è un  $\gamma$ -proteobatterio della famiglia delle *Pseudomonadaceae*, collocato nel gruppo *P. fluorescens* sulla base dell'analisi filogenetica del rRNA 16S (Anzai *et al.*, 2000). *P. marginalis* è un batterio terricolo, fitopatogeno di diverse colture alimentari e ornamentali, con capacità pectinolitiche (Membré e Burlot, 1994) Inoltre è stato identificato nella comunità batterica del corpo fruttifero del fungo ectomicorrizico *Cantharellus cibarius* (Rangel-Castro *et al.*, 2002)

*Pseudomonas synxantha* è un  $\gamma$ -proteobatterio fluorescente, Gram-negativo, (Anzai *et al.*, 2000) tipico della rizosfera con proprietà nematocide (Wechter *et al.*, 2002). Come per *P. marginalis*, *P. synxantha* fa parte della comunità batterica associata al *Cantharellus cibarius*, mostrando peraltro attività proteolitica ma non chitinolitica (Rangel-Castro *et al.*, 2002).

*Pseudomonas tolaasii* è un  $\gamma$ -proteobatterio terricolo, fluorescente, Gram-negativo, (Anzai *et al.*, 2000) agente di macchia batterica sui funghi coltivati come *Agaricus bisporus* (Brodey *et al.*, 1991), si caratterizza per la produzione di una micotossina detta tolasina (Soler-Rivas *et al.*, 1999). Inoltre, in patologia animale ha mostrato una forte attività emolitica provocando la lisi degli eritrociti (Munsch e Alatossava, 2002).

*Serratia plymuthica* è un  $\gamma$ -proteobatterio Gram-negativo, mesofilo, chemio-organotrofo, aerobio facoltativo, mobile, asporigeno di forma bastoncellare, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* (Neupane *et al.*, 2012). Ubiquitario, isolato su diversi substrati, sia naturali sia antropici, causa anche infezioni in ambienti nosocomiali (De Vleeschauwer e Höfte, 2003). Associato frequentemente alle piante, è stato rinvenuto nella rizosfera di diverse colture come grano (Åström e Gerhardson, 1988), granturco (Lucon e Melo, 2000), pomodoro (Frommel *et al.*, 1991) e sulle parti commestibili di cipolla, carota e lattuga (Grimont *et al.*, 1981). Pur considerato come contaminante delle linee di trasformazione degli ortaggi (Van Houdt *et al.*, 2005), viene usato con successo nella lotta di molti patogeni fungini terricoli di varie colture (Müller e Berg, 2008; Kalbe *et al.*, 1996) e per questo motivo è classificato tra i PGPR (Neupane *et al.*, 2012).

*Stenotrophomonas maltophilia* è un  $\gamma$ -proteobatterio appartenente alla famiglia delle *Xanthomonadaceae*. In passato è stato classificato come *Bacterium bookeri* nel 1943 (Chang, 2015) e riclassificato come *Pseudomonas maltophilia* (1961), *Xanthomonas* (1983) ed in fine *Stenotrophomonas* nel 1993 (Al-Anazi, 2014). È un batterio appartenente al gruppo dei Gram-negativi, mobile con flagelli polari, aerobio, non fermentante, catalasi-positivo e ossidasi-negativo, capace di formare biofilm su varie superfici. Ubiquitario di vari ambienti naturali umidi, è stato isolato nel suolo, in particolare nella rizosfera, ma anche in ambienti fortemente antropizzati come gli ospedali (tubi di aspirazione, nebulizzatori, endoscopi, rubinetti, lavandini etc.) (Brooke, 2012). Conosciuto in medicina umana come patogeno opportunista in individui immunodepressi, è stato associato a fibrosi cistica, polmoniti, infezioni urinarie, infezione del sangue, è riconosciuto come batterio antibioticoresistente (Chang, 2015).

*Variovorax paradoxus* è un  $\beta$ -proteobatterio, gram-negativo, aerobio, della famiglia delle *Comamonadaceae* (Willems *et al.*, 1991). Il nome del genere (vario = diverso – vorax = vorace) è dovuto all'ampia gamma di composti metabolizzabili. Morfologicamente le colonie si presentano di forma convessa, rotonde e lisce, di colore giallo-verde brillante dovuto alla produzione di carotenoidi (Satola *et al.*, 2013). Specie ubiquitaria, è stata isolata in ambienti di vario tipo, tra cui il suolo rizosferico di numerose specie vegetali, acqua potabile, acque sotterranee (Lee *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2010), sedimenti marini, (Wang e Gu, 2006) miniere d'argento (Piotrowska-Seget *et al.*, 2005), acqua di drenaggio delle miniere d'oro inquinate da arsenico, (Battaglia-Brunet *et al.*, 2006), etc. Per questa sua grande versatilità è stato ampiamente studiato (Satola *et al.*, 2013). I ceppi di *V. paradoxus* possono essere classificati in due gruppi – ossidanti di idrogeno e ceppi eterotrofi – entrambi aerobici (Davis *et al.*, 1969). Oltre ad essere un noto PGPR, trovando il giusto habitat di crescita anche all'interno dei tessuti vegetali (Reiter e Sessitsch, 2006; Santiago-Mora *et al.*, 2005; Sessitsch *et al.*, 2004; Sturz *et al.*, 2005; Surette *et al.*, 2003), ha dimostrato la capacità degradare diversi composti inquinanti, compresi gli erbicidi (Santiago-Mora *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005; Wang e Gu, 2006; Young *et al.*, 2006). Alcuni ceppi di *V. paradoxus* producono siderofori (Han *et al.*, 2011).

## 5. CONCLUSIONI

Le due aree tartufigene esaminate – SAG in località “San Santino” (454 m s.l.m.) in agro del Comune di Sant’Antonio di Gallura e LSF in località “Santa Sofia” (710 m s.l.m.) in agro del Comune di Laconi (OR) – non mostrano particolari differenze dal punto di vista climatico ma differiscono sotto il profilo vegetazionale e pedologico.

I due soprassuoli, pur essendo entrambi caratterizzati da una vegetazione a prevalenza di leccio, sono strutturalmente differenti. Infatti, l’area SAG presenta una copertura arborea con un unico strato dominante a chiome alte (tipica dell’alto fusto) e ridottissimo sottobosco; mentre l’area LSF ha le fattezze di un bosco ceduo in cui, oltre ai numerosi polloni di leccio, si osserva la diffusa presenza di specie arbustive.

Le analisi fisico-chimiche eseguite sui campioni di suolo hanno messo in evidenza le forti differenze pedologiche, sia strutturali sia nutrizionali, delle due tartufaie. Il profilo pedologico dell’area SAG mostra le caratteristiche tipiche dei suoli originatisi da rocce intrusive (Aru *et al.*, 1989). Si tratta di suoli poco profondi, a reazione subacida ( $\text{pH } 5,73 \pm 0,23$ ), con una tessitura sabbioso-limosa che garantisce un elevato drenaggio delle acque meteoriche ed una forte areazione. Al contrario, l’area LSF presenta suoli di origine calcarea a reazione decisamente basica ( $\text{pH } 8,03 \pm 0,27$ ) con una tessitura limosa, a drenaggio ridotto.

I suoli delle due aree hanno mostrato differiscono in modo statisticamente significativo anche per la maggior parte dei parametri chimici: macronutrienti (N, P, K), ferro, calcare attivo e totale, conducibilità elettrica e capacità di scambio cationico. Questo conferma l’elevata adattabilità del *Tuber borchii* che, come riportato in letteratura, vegeta in una grande varietà di suoli (Gardin, 2005; Iotti *et al.*, 2010; Raglione, 1997; 2005; Zambonelli, 1990).

Nei due suoli tartufigeni analizzati, la quantità di sostanza organica totale e le sue frazioni umiche non variano in maniera significativa. Tuttavia, nel sito LSF si rileva una migliore attitudine del suolo all’umificazione. Tale aspetto andrebbe ulteriormente indagato al fine di verificare se e come la quantità e la qualità della sostanza organica del suolo influenzano la presenza e/o la crescita del *T. borchii*.

I valori di conta microbica totale non hanno mostrato alcuna differenza apprezzabile nei campioni di suolo forestale dei due siti.

In effetti, nei campioni di suolo ascomico del sito SAG dopo 48 ore di incubazione si rileva una carica microbica maggiore rispetto agli omologhi del sito LSF, probabilmente dovuta ad un maggior numero di batteri zimogeni, caratterizzati da una rapida crescita per la metabolizzazione di sostanze semplici come zuccheri e loro derivati (Boyce, 1984); tale differenza non si osserva più dopo 96 ore di incubazione. Anche le analisi di ecologia microbica eseguite con tecnologia Biolog® Ecoplates™ sui campioni di suolo forestale non evidenziano alcuna differenza in termini di attività totale e di biodiversità funzionale delle comunità microbiche dei due siti.

Tuttavia, tale dato è in contrasto con quelli relativi all'identificazione genetica dei ceppi isolati. Difatti, escludendo la forte presenza di *Bacilli*, oltre il 30% in entrambi i siti, emerge una grande biodiversità batterica tra le comunità dei due suoli: nel suolo forestale del sito SAG predominano i *Betaproteobacteria* (20,69%) rispetto alle altre classi, mentre in quello del sito LSF sono gli *Actinobacteria* (18,75%) ad essere più numerosi.

La differenza qualitativa delle due comunità osservata per il suolo forestale si ripete anche nel suolo ascomico delle due provenienze geografiche. Difatti se nei campioni provenienti dal sito SAG dominano i *Gammaproteobacteria* (51,72%); nel sito LSF prevalgono sugli altri con una carica simile gli *Alphaproteobacteria* (23,08%) e i *Gammaproteobacteria* (20,51%).

Risulta particolarmente interessante aver rilevato che le comunità microbiche dei due siti, pur mostrandosi nettamente differenti tassonomicamente, non presentano alcuna differenza statisticamente rilevante dal punto di vista funzionale e metabolico, se non per il differente grado di utilizzo delle fonti di carbonio proposte, in particolar modo zuccheri, zuccheri fosfati, acidi carbossilici e aminoacidi probabilmente legato alle differenti caratteristiche chimico-fisiche dei suoli e alla diversità microbica.

Quindi, pur componendosi in modo differente, l'equilibrio funzionale raggiunto dalle due comunità microbiche lascia supporre che le caratteristiche fisico-chimiche dei suoli influenzano solo l'aspetto tassonomico e non anche quello ecologico-funzionale.

In altre parole, si osserva come la composizione specifica delle diverse specie batteriche formanti le due comunità microbiche, seppure in ambienti pedologici differenti, non influenza



in alcun modo la funzionalità ecologica delle stesse: tutte le attività trofico-funzionali vengono svolte in egual modo.

In accordo con i dati di conta totale riportati in letteratura (Sbrana *et al.*, 2000; Barbieri *et al.*, 2005) e riferiti alla carica microbica degli ascomi di *T. borchii*, si rileva che nella gleba la componente batterica è dell'ordine di  $10^6$  ufc/g; valori simili vengono riportati anche per altre specie di *Tuber*: *T. aestivum* (Gryndler *et al.*, 2013), *T. magnatum* (Barbieri *et al.*, 2007) e *T. melanosporum* (Rivera *et al.*, 2010).

Nei campioni di peridio provenienti da entrambi i siti è presente una carica microbica più elevata ( $10^8$  ufc/g) rispetto a quella registrata in tutte le altre matrici analizzate. Differenze di conta microbica tra le diverse porzioni ascomiche sono già state riportate in letteratura per *T. melanosporum* (Rivera *et al.*, 2010; Antony-Babu *et al.*, 2014).

Anche l'ambiente ascomico riserva delle sorprese riguardo la composizione delle comunità microbiche ad esso associate. Le analisi di identificazione fenotipica operate con tecnologia Biolog® Gen III™ mostrano significative differenze di composizione tra le due comunità. La famiglia delle *Pseudomonadaceae* predomina nel peridio di tutti gli ascomi (85% in CAP e 50% in GAP); quella delle *Comamonadaceae* si rileva esclusivamente nei campioni prelevati nel sito LSF e quella delle *Xanthomonadaceae* domina nella gleba proveniente dal sito SAG. In accordo con quanto riscontrato in letteratura, si osserva la dominanza degli *Gammaproteobacteria* (51,72%) e degli *Alphaproteobacteria* (23,08%) (Sbrana *et al.*, 2002).

Dal punto di vista tassonomico si osservano differenze di composizione delle comunità batteriche tra i corpi fruttiferi campionati nei due siti, tra corpo fruttifero e suolo ascomico nonché tra corpo fruttifero e suolo forestale. Ciò suggerisce che ogni micro-ambiente rilevato in questo studio è una nicchia ecologica che seleziona specifiche comunità batteriche. Tale ipotesi è supportata da quanto già riportato in letteratura riguardo il *T. melanosporum*. Per questa specie è stato dimostrato che vi sono significative differenze quanti-qualitative tra le comunità microbiche associate alle diverse parti dell'ascoma, al relativo habitat pedologico ed alle diverse fasi di maturazione dell'ascoma (Warmink *et al.*, 2009; Antony-Babu *et al.*, 2014).

Lo stesso Antony-Babu (2014) ipotizza che le differenze tra le comunità batteriche rilevate nelle due porzioni ascomiche siano dovute alle modalità con cui si sviluppano gli ascomi. Sembrerebbe infatti che la colonizzazione dei tessuti fungini da parte dei batteri terricoli si verifichi prima della completa differenziazione tra peridio e gleba. Di conseguenza, pur partendo da una stessa comunità batterica, a seguito dei mutamenti morfo-anatomici dell'ascoma, si verificano differenti pressioni selettive che tendono a favorire determinati gruppi batterici rispetto ad altri. Allo stesso modo, in considerazione delle differenze rilevate in questo studio sulle comunità microbiche nelle diverse porzioni ascomiche di *T. borchii*, questa ipotesi potrebbe essere considerata valida e giustificerebbe inoltre la diversità rilevata tra le comunità batteriche degli ascomi dei due siti: la differente comunità microbica terricola darebbe luogo a differenti selezioni batteriche da parte dell'habitat ascomico. Tuttavia resta da chiarire se il differente ambiente pedologico di crescita ~~pedologica~~ può influenzare le pressioni selettive operate dalla nicchia ascomica di *T. borchii*.

Tra i batteri rilevati nell'ascoma di *T. borchii* sono state isolate e identificate alcune specie ascrivibili ai PGPR (*Serratia plymuthica*, *Variovorax paradoxus*), saprofiti e patogeni dei funghi (*Collimonas fungivorans*, *Pseudomonas tolaasii*) e patogeni umani (*Inquilinus limosus* B, *Serratia plymuthica*, *Stenotrophomonas maltophilia*). Ulteriori studi dovrebbero essere compiuti proprio su quest'ultimo gruppo microbico, già rilevato nella rizosfera (Berg *et al.*, 2005), considerando che l'uso gastronomico degli ascomi dei tartufi avviene a crudo.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Al-Anazi K.A.**, Al-Jasser A.M. (2014). Infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in recipients of hematopoietic stem cell transplantation. *Frontiers in oncology*, 4.
- Agerer R.** (1991). Characterization of ectomycorrhiza. In: Norris, JR, Read, DJ, Varma, AK, eds. Techniques for the study of mycorrhiza. London, UK: *Academic Press*, 25-73.
- Agerer R.** (1987). Colour atlas of ectomycorrhizae Einhorn-Verlag Eduard Dietenberger GmbH. Schwäbisch Gmünd, 1998.
- Angle J.S.** (1986). Pectic and proteolytic enzymes produced by fast-and slow-growing soybean rhizobia. *Soil biology and biochemistry*, 18(1), 115-116.
- Antony-Babu S.**, Deveau A., Van Nostrand J.D., Zhou J., Le Tacon F., Robin C. (2014). Black truffle-associated bacterial communities during the development and maturation of *Tuber melanosporum* ascocarps and putative functional roles. *Environmental microbiology*, 16(9), 2831-2847.
- Anzai Y.**, Kim H., Park J.Y., Wakabayashi H., Oyaizu H. (2000). Phylogenetic affiliation of the *Pseudomonads* based on 16S rRNA sequence. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(4), 1563-1589.
- Arrigoni P. V.** (1968). Fitoclimatologia della Sardegna. *Webbia*, 23(1), 1-100.
- Arrigoni P. V.** (1983). Aspetti corologici della flora sarda. *Biogeographia*, 8(1).
- Arshad M.**, Frankenberger W.T. Jr (1991). Effects of soil properties and trace elements on ethylene production in soils. *Soil Science*, 151(5), 377-386.
- Arshad M.**, Frenkenberger W.T. Jr (1993). Microbial production of plant growth regulators. In: Meeting FB Jr (ed) *Soil microbial ecology*. Dekker, New York, 307-347
- Aru A.**, Baldaccini P., Vacca A., Delogu G., Dessena M.A., *et al.* (1989). Nota illustrativa alla carta dei suoli della Sardegna. *Dipartimento di Scienze della Terra Università degli Studi di Cagliari, Assessorato Regionale alla Programmazione Bilancio ed Assetto del Territorio*, Cagliari.
- Aspray T.J.**, Frey-Klett P., Jones J.E., Whipps J.M., Garbaye J., *et al.* (2006). Mycorrhization helper bacteria: a case of specificity for altering ectomycorrhiza architecture but not ectomycorrhiza formation. *Mycorrhiza*, 16(8), 533-541

- Aspray T.J.**, Jones E.E., Davies M.W., Shipman M., Bending G.D. (2013). Increased hyphal branching and growth of ectomycorrhizal fungus *Lactarius rufus* by the helper bacterium *Paenibacillus* sp. *Mycorrhiza*, 23(5), 403-410.
- Åström B.**, Gerhardson B. (1988). Differential reactions of wheat and pea genotypes to root inoculation with growth-affecting rhizosphere bacteria. *Plant and Soil*, 109(2), 263-269.
- Barbieri E.**, Potenza L., Stocchi V. (2001). Molecular characterization of cellulolytic-chitinolytic bacteria associated with fruitbodies of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad. *Symbiosis*, 30(2), 123-139.
- Barbieri E.**, Riccioni G., Pisano A., Sisti, D., Zeppa S., Agostini D., Stocchi, V. (2002). Competitive PCR for quantitation of a *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* phylum bacterium associated with the *Tuber borchii* Vittad. mycelium. *Applied and environmental microbiology*, 68(12), 6421-6424.
- Barbieri E.**, Bertini L., Rossi I., Ceccaroli P., Saltarelli R., Guidi C., *et al.* (2005). New evidence for bacterial diversity in the ascoma of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad. *FEMS Microbiology Letters*, 247(1), 23-35.
- Barbieri E.**, Guidi C., Bertaux J., Frey-Klett P., Garbaye J., Ceccaroli P., *et al.* (2007). Occurrence and diversity of bacterial communities in *Tuber magnatum* during truffle maturation. *Environmental Microbiology*, 9(9), 2234-2246.
- Barbieri P.**, Bestetti G., Galli E. Zannoni D. (4th ed.). (2008). *Microbiologia ambientale ed elementi di ecologia microbica*. CEA. Milano.
- Battaglia-Brunet F.**, Itard Y., Garrido F., Delorme F., Crouzet C., *et al.* (2006). A simple biogeochemical process removing arsenic from a mine drainage water. *Geomicrobiology Journal*, 23(3-4), 201-211.
- Bedini S.**, Bagnoli G., Sbrana C., Leporini C., Tola E., Dunne C., *et al.* (1999). Pseudomonads isolated from within fruit bodies of *Tuber borchii* are capable of producing biological control or phytostimulatory compounds in pure culture. *Symbiosis* (Rehovot), 26(3), 223-236.
- Berg G.**, Eberl L., Hartmann A. (2005). The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, 7(11), 1673-1685.
- Bochner B.** (1989a). "Breathprints" at the microbial level. *ASM American Society for Microbiology News*, 55(10), 536-539.

- Bochner B.** (1989b). Sleuthing out bacterial identities. *Nature*, 339(6220), 157-158.
- Bonfante P., Anca I.A.** (2009). Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual review of microbiology*, 63, 363-383.
- Boni C., Puxeddu M., Tocci A.V.** (1991). Ecologia e possibilità di coltivazione di *Tuber borchii* Vitt. (*Tuber albidum* Pico) in Sardegna. *EM delle Regioni* 44-46.
- Bonito G.M., Gryganskyi A.P., Trappe J.M., Vilgalys R.** (2010) A global meta-analysis of *Tuber* ITS rDNA sequences: species diversity, host associations and long-distance dispersal. *Molecular Ecology*, 19(22), 4994-5008.
- Bottomley P.J., Dughri M.H.** (1989). Population size and distribution of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in relation to total soil bacteria and soil depth. *Applied and environmental microbiology*, 55(4), 959-964.
- Bottomley P.J., Maggard S.P.** (1990). Determination of viability within serotypes of a soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Applied and environmental microbiology*, 56(2), 533-540.
- Boyce M.S.** (1984). Restitution of gamma-and K-Selection as a Model of Density-Dependent Natural Selection. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15(1), 427-447..
- Bragato G., Gardin L., Lulli L., Raglione M.** (2006). Tartufi eduli. In: Costantini, E.A.C. (Ed.), *Metodi di valutazione dei suoli e delle terre*, Cantagalli, Siena. 922.
- Brooke J.S.** (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 25(1), 2-41.
- Brulé C., Frey-Klett P., Pierrat J. C., Courrier S., Gérard F., et al.** (2001). Survival in the soil of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* and the effects of a mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(12), 1683-1694..
- Burr T.J. Caesar A., Schrolh M.N.** (1984). Beneficial plant bacteria. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2(1), 1-20.
- Brannen P.M., Backman P.A.** (1994). Suppression of *Fusarium* wilt of cotton with *Bacillus subtilis* hopper box formulations. In: Ryder MH, Stephens PM, Bowen GD (eds) *Improving plant productivity with rhizosphere bacteria*, proceedings from the third international workshop on plant growth-promoting rhizobacteria. CSIRO Press, Adelaide, pp 83–85

- Brierley J.A.** (1985). Use of microorganisms for mining metals. In: Halvorson HO, Pramer D, Rogul M (eds) Engineered organisms in the environment: scientific issues. *ASM Press*, Washington. 141–146
- Brodey C.L.**, Rainey P.B., Tester M., Johnstone K. (1991). Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom is caused by an ion channel forming lipodepsipeptide toxin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4(4), 407-411.
- Brundrett M.** (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews*, 79(3), 473-495.
- Brundrett M.** (2008). Ectomycorrhizas. In: *Mycorrhizal Associations: The Web Resource*. Version 2.0. Date accessed. <mycorrhizas.info>.
- Brundrett M.** (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil*, 320(1-2), 37-77.
- Büntgen U.**, Egli S., Camarero J.J., Fischer E.M., Stobbe U., *et al.* (2012). Drought-induced decline in Mediterranean truffle harvest. *Nature Climate Change*, 2(12), 827.
- Burd G.**, Dixon D.G., Glick B.R. (2000). Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian journal of microbiology*, 46(3), 237-245.
- Burkhardt C.**, Insam H., Hutchins, T.C., Reber H.H. (1993). Impact of heavy metals on the degradative capabilities of soil bacterial communities. *Biology and Fertility of Soils*, 16(2), 154-156.
- Buzzini P.**, Gasparetti C., Turchetti B., Cramarossa M.R., Vaughan-Martini A., Martini A., *et al.* (2005). Production of volatile organic compounds (VOCs) by yeasts isolated from the ascocarps of black (*Tuber melanosporum* Vitt.) and white (*Tuber magnatum* Pico) truffles. *Archives of microbiology*, 184(3), 187-193.
- Cavalli-Sforza L.** (1966). Analisi statistica per medici e biologi e analisi del dosaggio biologico. Bollati Boringhieri, Torino.
- Campbell C.D.**, Grayston S.J., Hirs, D.J. (1997). Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 30(1), 33-41.

- Chang Y.T.**, Lin C.Y., Chen Y.H., Hsueh P.R. (2015). Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. *Frontiers in microbiology*, 6.
- Chatterjee A.K.**, Buchanan G.E., Behrens M.K., Starr M.P. (1978). Synthesis and excretion of polygalacturonic acid trans-eliminase in *Erwinia*, *Yersinia*, and *Klebsiella* species. *Canadian journal of microbiology*, 25(1), 94-102.
- Ciancio O.**, Nocentini S. (2009). Gestione forestale e Fauna: l'approccio sistemico. *L'Italia Forestale e Montana*, (1).
- Ciancio O.** (2012). Riflessioni di un forestale: i diritti del bosco per un presente vivibile e un futuro possibile. *Italian Journal of Forest and Mountain Environments*, 67(1), 55-64.
- Ciavatta C.**, Govi M., Antisari L.V., Sequi P. (1990). Characterization of humified compounds by extraction and fractionation on solid polyvinylpyrrolidone. *Journal of Chromatography A*, 509(1), 141-146.
- Citterio B.**, Cardoni P., Potenza L., Amicucci A., Stocchi V., Gola G., Nuti M. (1995). Isolation of Bacteria from sporocarps of *Tuber Magnatum* Pico, *Tuber Borchii* Vitt. and *Tuber Maculatum* Vitt. In *Biotechnology of ectomycorrhizae* (pp. 241-248). Springer, Boston, MA.
- Cocking E.C.** (2003). Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant Soil* 252(1):169–175
- Cole J.R.**, Wang, Q., Fish J.A., Chai B., McGarrell D.M., *et al.* (2013). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic acids research*, 42(D1), D633-D642.
- Costerton W.J.** (2005); Biofilm Microbici 2005. Atti del I Workshop nazionale Istituto Superiore di Sanità Roma, 20-21 giugno 2005.
- Cameron D.D.**, Neal A.L., van Wees S.C.M., Ton J. (2013). Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts?. *Trends in plant science*, 18(10), 539-545.
- Ceruti A.**, Fontana A., Nosenzo C. (2003). Le specie europee del genere *Tuber*: una revisione storica (Vol. 37). Museo Reg. Scienze Nat. Torino.
- Champomier-Vergès M.C.**, Stintzi A., Meyer J.M. (1996). Acquisition of iron by the non-siderophore-producing *Pseudomonas fragi*. *Microbiology*, 142(5), 1191-1199.

- Cleyet-Marcel J.C.**, Larcher M., Bertrand H., Rapior S., Pinochet X. (2001). Plant growth enhancement by rhizobacteria. In: MorotGaudry JF (ed) Nitrogen assimilation by plants: physiological, biochemical and molecular aspects. Science Publishers, *Plymouth*, pp 185–197
- Climate-data.org** (consultation of 2017) Historical average temperature and rainfall. <http://climate-data.org/>.
- Coenye T.**, Goris, J., Spilker, T., Vandamme P., LiPuma J.J. (2002). Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. *Journal of clinical microbiology*, 40(6), 2062-2069.
- Courty P.E.**, Buée M., Diedhiou A.G., Frey-Klett P., Le Tacon F., Rineau F., *et al.* (2010). The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 679-698.
- Dangar T.K.**, Basu P.S. (1987). Studies on plant growth substances, IAA metabolism and nitrogenase activity in root nodules of *Phaseolus aureus* Roxb. var. mungo. *Biologia plantarum*, 29(5), 350-354.
- Davis D.H.**, Doudoroff M., Stanier R.Y., Mandel M. (1969). Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: taxonomic implications. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 19(4), 375-390.
- Davison J.** (1988). Plant beneficial bacteria. *Nature Biotechnology*, 6(3), 282-286.
- Dearnaley J.** (2007). Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17(6), 475-486.
- De Boer W.**, Gerards S., Klein Gunnewiek P.J.A. Modderman R. (1999). Response of the chitinolytic microbial community to chitin amendments of dune soils. *Biology and Fertility of Soils*, 29(2), 170-177.
- De Boer W.**, Klein Gunnewiek P.J.A., Kowalchuk G.A. Van Veen J.A. (2001). Growth of Chitinolytic Dune Soil  $\beta$ -Subclass Proteobacteria in Response to Invading Fungal Hyphae. *Applied and environmental microbiology*, 67(8), 3358-3362.
- De Boer W.**, Leveau J.H., Kowalchuk G.A., Gunnewiek P.J.K., Abeln E.C., *et al.* (2004). *Collimonas fungivorans* gen. nov., sp. nov., a chitinolytic soil bacterium with the ability to grow on living fungal hyphae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(3), 857-864.



- De Vleeschauwer D., Höfte M.** (2003). Using *Serratia plymuthica* to control fungal pathogens of plants. *CAB Reviews*, 2(046).
- Deveau A., Palin B., Delaruelle C., et al.** (2007). The mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 has a specific priming effect on the growth, morphology and gene expression of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *New Phytol* 175:743–755.
- Deveau A., Palin B., Delaruelle C., Peter M., Kohler A., Pierrat J.C., et al.** (2007). The mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 has a specific priming effect on the growth, morphology and gene expression of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *New Phytologist*, 175(4), 743-755.
- Deveau A., Gross H., Palin B., Mehnaz S., Schnepf M., et al.** (2016). Role of secondary metabolites in the interaction between *Pseudomonas fluorescens* and soil microorganisms under iron-limited conditions. *FEMS microbiology ecology*, 92(8).
- Desirò A., Faccio A., Kaech A., Bidartondo M.I., Bonfante P.** (2015). Endogone, one of the oldest plant-associated fungi, host unique Mollicutes-related endobacteria. *New Phytologist*, 205(4), 1464-1472.
- Dobbelaere S., Vanderleyden J., Okon Y.** (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical reviews in plant sciences*, 22(2), 107-149.
- Domínguez-Núñez J., Muñz D., De La Cruz A., Saiz De Omeñaca J.** (2013). Effects of *Pseudomonas fluorescens* on the water parameters of mycorrhizal and non-mycorrhizal seedlings of *Pinus halepensis*. *Agronomy*, 3(3), 571-582.
- Duponnois R., Garbaye J.** (1990). Some mechanisms involved in growth stimulation of ectomycorrhizal fungi by bacteria. *Canadian journal of botany*, 68(10), 2148-2152.
- Duponnois, R., Garbaye, J.** (1991). Mycorrhization helper bacteria associated with the Douglas fir-*Laccaria laccata* symbiosis: effects in aseptic and in glasshouse conditions. In *Annales des Sciences Forestières* (Vol. 48, No. 3, pp. 239-251). EDP Sciences.
- Eden P.A., Schmidt T.M., Blakemore R.P., Pace N.R.** (1991) Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(2), 324-325.

- Edwards U.**, Rogall T., Blocker H., Emde M., Bottger E.C. (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic acids research*, 17(19), 7843-7853
- Ehrlich H.L.** (1990). Geomicrobiology, 2nd edn. Dekker, New York. 646
- El-Sayed A.K.**, Hothersall J., Cooper S.M., Stephens E., Simpson T.J., Thomas C.M. (2003). Characterization of the mupirocin biosynthesis gene cluster from *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Chemistry & biology*, 10(5), 419-430
- Ferrarotti M.**, Piccarolo P. (1997). Agronomia In: Bianchi P.G., Castelli P.G.C. (1997). Manuale di agricoltura. Hoepli, Milano. 53–220.
- Florenzano G.** (1983). Fondamenti di microbiologia del terreno. REDA. Roma.
- Founoune H.**, Duponnois R., Bâ A.M., Sall S., Branget, I., *et al.* (2002). Mycorrhiza helper bacteria stimulate ectomycorrhizal symbiosis of *Acacia holosericea* with *Pisolithus alba*. *New Phytologist*, 153(1), 81-89.
- Frank, A. B.** (1887). Ueber einige neue und weniger bekannte Pflanzenkrankheiten.
- Frey-Klett P.**, Chavatte M., Clausse M.L., Courrier S., Roux C.L., Raaijmakers, J., *et al.* (2005). Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New phytologist*, 165(1), 317-328.
- Frey-Klett P.**, Garbaye J., Tarkka M. (2007). The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New phytologist*, 176(1), 22-36.
- Frommel M.I.**, Pazos G.S., Nowak J. (1991). Plant-growth stimulation and biocontrol of *Fusarium* wilt(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) by co-inoculation of tomato seeds with *Serratia plymuthica* and *Pseudomonas* sp. *Fitopatologia*, 26(2), 66-73.
- Fusconi A.**, Bonfante-Fasolo P. (1984). Ultrastructural aspects of host-endophyte relationships in *Arbutus unedo* L. mycorrhizas. *New Phytologist*, 96(3), 397-410.
- Galet J.**, Deveau A., Hôtel L., Frey-Klett P., Leblond P., Aigle B. (2015). *Pseudomonas fluorescens* pirates both ferrioxamine and ferricoelichelin siderophores from *Streptomyces ambofaciens*. *Applied and environmental microbiology*, 81(9), 3132-3141.
- Gao W.**, Gentry T.J., Mehlhorn T.L., Carroll S.L., Jardine P.M., Zhou J. (2010). Characterization of Co (III) EDTA-reducing bacteria in metal-and radionuclide-contaminated groundwater. *Geomicrobiology Journal*, 27(1), 93-100.

- Gasparini, P.,** Tabacchi, G. (2011). L'Inventario Nazionale delle Foreste e dei serbatoi forestali di Carbonio INFC 2005. Secondo inventario forestale nazionale italiano. Metodi e risultati.
- Garbaye J.,** Bowen G. (1989). Stimulation of ectomycorrhizal infection of *Pinus radiata* by some microorganisms associated with the mantle of ectomycorrhizas. *New Phytologist*, 112(3), 383-388.
- Garbaye J.,** Duponnois R. (1992). Specificity and function of mycorrhization helper bacteria (MHB) associated with the *Pseudotsuga menziesii*–*Laccaria laccata* symbiosis. *Symbiosis* (14), 335-344.
- Garbaye J.** (1994). Mycorrhiza helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* (128) 197–210.
- Garbaye J.,** Montecchio L., Motta E. (2006). La micorrizazione controllata di alberi forestali e ornamentali. *Petria* 16 (3), 327-346
- García de Salamone I.E.,** Hynes R.K., Nelson L.M. (2001) Cytokinin production by plant growthpromoting rhizobacteria and selected mutants. *Can J Microbiol* 47(5):404–411
- Gardin L.** (2005). I tartufi minori in Toscana. Gli ambienti di crescita dei tartufi maruolo e scorzone. *Quaderno ARSIA*, 1/2005, Firenze.
- Garland J.L.,** Mills, A.L. (1991). Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and environmental microbiology*, 57(8), 2351-2359.
- Giannini R.,** Susmel L. (2006). Foreste, boschi, arboricoltura da legno. *Forest@-Journal of Silviculture and Forest Ecology*, 3(4), 464.
- Gibelli G.,** (1882). Flora del Modenese e del Reggiano. Tip. GT Vincenzi.
- Giomaro G.M.,** Sisti D., Zambonelli A. (2005): Cultivation of edible ectomycorrhizal fungi by in vitro mycorrhizal synthesis. *In vitro culture of mycorrhizas*, 253-267.
- Glick B.R.** (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(2), 109-117.
- Glick B.R.,** Pasternak J.J. (2003). Plant growth promoting bacteria. In: Glick BR, Pasternak JJ (eds) *Molecular biotechnology principles and applications of recombinant DNA*, 3rd edn. ASM Press, Washington. 436–454

- Goldstein A.H.** (1986) Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture*, 1(2), 51-57.
- Gray E.J., Smith D.L.** (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 395-412.
- Grimont P.A., Grimont F., Starr M.P.** (1981). *Serratia* species isolated from plants. *Current Microbiology*, 5(5), 317-322.
- Gryndler M., Soukupová L., Hřselová H., Gryndlerová H., Borovička J., Streiblová E., et al.** (2013). A quest for indigenous truffle helper prokaryotes. *Environmental microbiology reports*, 5(3), 346-352.
- Gutiérrez-Mañero F.G., Ramos-solano B., Probanza A., Mehouchi J., Tadeo F.R., et al.** (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 111(2), 206-211.
- Haack S.K., Garchow H., Klug M.J., Forney, L.J.** (1995). Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1458-1468.
- Hall I.R., Wang Y., Amicucci A.** (2003). Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *TRENDS in Biotechnology*, 21(10), 433-438..
- Hall I., Brown G., Zambonelli A.** (2007). Taming the Truffle. The History, Lore, and Science of the Ultimate Mushroom. Timber Press, Portland, OR.
- Han J.I., Choi H.K., Lee S.W., Orwin P.M., Kim J., LaRoe S.L.** (2011). Complete genome sequence of the metabolically versatile plant growth-promoting endophyte *Variovorax paradoxus* S110. *Journal of bacteriology*, 193(5), 1183-1190.
- Hayat R., Ali S., Amara U., Khalid R., Ahmed I.** (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579-598.
- Hernández-Montiel L.G., Rueda-Puente E.O., Cordoba-Matson M. V., Holguín-Peña J. R., Zulueta-Rodríguez R.** (2013). Mutualistic interaction of rhizobacteria with arbuscular mycorrhizal fungi and its antagonistic effect on *Fusarium oxysporum* in *Carica papaya* seedlings. *Crop protection*, 47, 61-66.

- Hildebrandt U.**, Ouziad F., Marner F.J., Bothe H. (2006). The bacterium *Paenibacillus validus* stimulates growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* up to the formation of fertile spores. *FEMS Microbiology Letters*, 254(2), 258-267.
- Hitzl W.**, Henrich M., Kessel M., Insam H. (1997). Application of multivariate analysis of variance and related techniques in soil studies with substrate utilization tests. *Journal of Microbiological Methods* 30 (1997) 81-89.
- Hryniewicz K.**, Baum C., Leinweber P. (2009). Mycorrhizal community structure, microbial biomass P and phosphatase activities under *Salix polaris* as influenced by nutrient availability. *European Journal of Soil Biology*, 45(2), 168-175.
- Hsueh P.R.**, Teng L.J., Pan H.J., Chen Y.C., Sun C.C., Ho S.W., Luh, K.T. (1998). Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bacteremia among oncology patients. *Journal of clinical microbiology*, 36(10), 2914-2917.
- Huang X.D.**, El-Alawi Y., Penrose D.M., Glick B.R., Greenberg B.M. (2004). A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environmental pollution*, 130(3), 465-476.
- Huang X.D.**, El-Alawi Y., Gurska J., Glick B.R., Greenberg B.M. (2005). A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. *Microchemical Journal*, 81(1), 139-147.
- Iotti M.**, Piattoni F., Zambonelli A. (2010). Nuove conoscenze sull'ecologia di *Tuber borchii* dallo studio delle comunità fungine ectomicorriziche. Incontro Scientifico Università degli Studi di Urbino “Carlo Bo”
- Janssen P.H.** (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology*, 72(3), 1719-1728.
- Jung H.M.**, Lee J.S., Bae H.M., Yi T.H., Kim S.Y., Lee S.T., Im W.T. (2011). *Inquilinus ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(1), 201-204.
- Kalbe C.**, Marten P., Berg, G. (1996). Strains of the genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape with antifungal properties. *Microbiological research*, 151(4), 433-439.
- Kamilova F.**, Leveau, J.H., Lugtenberg B. (2007). *Collimonas fungivorans*, an unpredicted in vitro but efficient in vivo biocontrol agent for the suppression of tomato foot and root rot. *Environmental microbiology*, 9(6), 1597-1603.

- Khan A.G.** (2005). Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18(4), 355-364.
- Kloepper J.W.**, Schroth M.N. (1978). Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. Proceedings of the Fourth International Conference on Plant Pathogen Bacteria, vol. 2. INRA. 879–882
- Kloepper J.W.**, Lifshitz R., Zablotowicz R.M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in biotechnology*, 7(2), 39-44.
- Kogl F.**, Haagen-Smit A.J. (1931). Über die Chemie des Wuchsstoffs K. Akad. Wetenschap. Amsterdam. *Proc. Sect. Sci.*, 34, 1411-1416.
- Kokalis-Burelle N.**, Kloepper J.W., Reddy M.S. (2006). Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology*, 31(1), 91-100.
- Köppen W.**, Geiger R. (1930). Handbuch der klimatologie (Vol. 3, No. 1). Berlin, Germany: Gebrüder Borntraeger.
- Kurth F.**, Zeitler K., Feldhahn L., Neu, T.R., Weber T., Křišťůfek V., *et al.* (2013). Detection and quantification of a mycorrhization helper bacterium and a mycorrhizal fungus in plant-soil microcosms at different levels of complexity. *BMC microbiology*, 13(1), 205.
- Labbé J.L.**, Weston D.J., Dunkirk N., Pelletier D.A., Tuskan, G.A. (2014). Newly identified helper bacteria stimulate ectomycorrhizal formation in *Populus*. *Frontiers in plant science*, 5.
- Lancellotti E.**, Iotti M., Zambonelli A., Franceschini, A. (2014). Characterization of *Tuber borchii* and *Arbutus unedo* mycorrhizas. *Mycorrhiza*, 24(6), 481-486.
- Leake J.R.** (2005). Plants parasitic on fungi: unearthing the fungi in myco-heterotrophs and debunking the ‘saprophytic’ plant myth. *Mycologist*, 19(3), 113-122.
- Lee J.**, Lee C.S., Hugunin K.M., Maute C.J., Dysko R.C. (2010). Bacteria from drinking water supply and their fate in gastrointestinal tracts of germ-free mice: a phylogenetic comparison study. *Water research*, 44(17), 5050-5058.
- Lehr N.A.**, Schrey S.D., Bauer R., Hampp R., Tarkka M.T. (2007). Suppression of plant defence response by a mycorrhiza helper bacterium. *New Phytologist*, 174(4), 892-903.

- Li B.**, Ravnskoy S., Xie G., Larsen J. (2008). Differential effects of *Paenibacillus* spp. on cucumber mycorrhizas. *Mycological progress*, 7(4), 277-284.
- Li C.**, Massicote H., Moore L.V.H. (1992). Nitrogen-fixing *Bacillus* sp. associated with Douglas-fir tuberculate ectomycorrhizae. *Plant and Soil*, 140(1), 35-40.
- Loper J.E.**, Buyer J.S. (1991). Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 4(1), 5-13.
- Lucon C.M.M.**, Melo I.S. (2000). Effect of seed bacterization on the development of maize plants and *Fusarium moniliforme* control. *Fitopatologia Brasileira*, 25(3), 529-537.
- Lynch J.M.** (1983) Soil biotechnology. Blackwell, Oxford
- Lynch J.M.** (1990.) Beneficial interactions between micro-organisms and roots. *Biotechnology advances*, 8(2), 335-346.
- Malajczuk N.**, Reddel P.P., Brundrett M., (1994). Role of ectomycorrhizal fungi in minesite reclamation. In: Pfefer F.L., R.G. Linderman (Eds), *Mycorrhizae and plant health*, APS Press, St. Paul, MN, USA, 83-100.
- Martins M.A.** (1993). The role of the external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in the carbon transfer process between plants. *Mycological research*, 97(7), 807-810.
- Mello A.**, Murat C., Bonfante P. (2006). Truffles: much more than a prized and local fungal delicacy. *FEMS Microbiology Letters*, 260(1), 1-8.
- Membré J.M.**, Burlot, P.M. (1994). Effects of temperature, pH, and NaCl on growth and pectinolytic activity of *Pseudomonas marginalis*. *Applied and environmental microbiology*, 60(6), 2017-2022.
- Middledrop P.J.M.**, Briglia M., Salkinoja-Salonen M. (1990). Biodegradation of pentachlorophenol in natural soil by inoculated *Rhodococcus chlorophenolicus*. *Microbial ecology*, 20(1), 123-139.
- Milton H.S.J** (2007). Beneficial bacteria and bioremediation. *Water Air Soil Pollut* 184:1–3
- Montecchi A.**, Sarasini M. (2000). Funghi ipogei d'Europa. Fondazione Centro Studi Micologici. Associazione Micologica Bresadola, Trento.
- Montecchio L.** (2006). Il ruolo delle simbiosi ectomicorriziche nel benessere delle piante forestali. *Petria* 16 (3), 321-326 (2006)

- Morte A.**, Navarro-Ro'denas A., Nicola's E. (2010). Physiological parameters of desert truffle mycorrhizal *Helianthemum almeriense* plants cultivated in orchards under water deficit conditions. *Symbiosis*, 52(2-3), 133-139.
- Mosse B.** (1962.) The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *Microbiology*, 27(3), 509-520
- Müller H.**, Berg G. (2008). Impact of formulation procedures on the effect of the biocontrol agent *Serratia plymuthica* HRO-C48 on *Verticillium* wilt in oilseed rape. *BioControl*, 53(6), 905-916.
- Munsch P.**, Alatosava, T. (2002). Several pseudomonads, associated with the cultivated mushrooms *Agaricus bisporus* or *Pleurotus* sp., are hemolytic. *Microbiological research*, 157(4), 311-315.
- Muyzer G.**, de Waal E.C., Uitterlinden A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 59(3), 695-700.
- Narasimhan K.**, Basheer C., Bajic V.B., Swarup S. (2003). Enhancement of plant-microbe interactions using a rhizosphere metabolomics-driven approach and its application in the removal of polychlorinated biphenyls. *Plant Physiology*, 132(1), 146-153.
- Neumann M.**, Di Silverio F. (1987). Vademecum degli antibiotici ed agenti chemioterapici anti-infettivi. Marrapese-DEMI.
- Naumann M.**, Schüssler A., Bonfante P. (2010). The obligate endobacteria of arbuscular mycorrhizal fungi are ancient heritable components related to the Mollicutes. *The ISME Journal*, 4(7), 862-871.
- Neupane S.**, Högborg N., Alström S., Lucas S., Han J., Lapidus A., Peters, L. (2012). Complete genome sequence of the rapeseed plant-growth promoting *Serratia plymuthica* strain AS9. *Standards in genomic sciences*, 6(1), 54.
- Nuti M.**, Sbrana C. (2013) Il tartufo: una simbiosi multipla. Accademia dei Georgofili-Accademia Italiana della Cucina Giornata di studio Pisa 7/3/2013.
- Pacioni G.**, Leonardi M., Aimola P., Ragnelli A.M., Rubini A., Paolocci, F. (2007). Isolation and characterization of some mycelia inhabiting *Tuber* ascomata. *Mycological research*, 111(12), 1450-1460.



- Paul L.R.**, Chapman W.K., Chanway C.P. (2013). Diazotrophic bacteria reside inside *Suillus tomentosus*/Pinus contorta tuberculate ectomycorrhizae. *Botany*, 91(1), 48-52.
- Pereira J.N.**, Morgan M.E. (1957). Nutrition and physiology of *Pseudomonas fragi*. *Journal of bacteriology*, 74(6), 710.
- Perotto S.**, Angelini P., Bianciotto V., Bonfante P., Girlanda M., Kull T., et al. (2013). Interactions of fungi with other organisms. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 147(1), 208-218
- Persello-Cartieaux F.**, Nussaume L., Robaglia C. (2003). Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell & Environment*, 26(2), 189-199.
- Piotrowska-Seget Z.**, Cycoń M., Kozdroj J. (2005). Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. *Applied Soil Ecology*, 28(3), 237-246.
- Plassard C.**, Bonafos B., Touraine B. (2000). Differential effects of mineral and organic N sources, and of ectomycorrhizal infection by *Hebeloma cylindrosporum*, on growth and N utilization in *Pinus pinaster*. *Plant, Cell & Environment*, 23(11), 1195-1205.
- Raglione M.**, De Simone C., Lorenzoni P., 1997. La qualità del suolo in relazione ad un uso agricolo sostenibile del territorio. Un'applicazione alla tartuficoltura. Conv. SISS, Roma, 3-5 giugno.
- Raglione M.**, Owczarek M., (2005). The soils of natural environments for growth of truffles in Italy. *Mycologia balcanica*, 3(2), 209-216.
- Rangel-Castro J.I.**, Levenfors J.J., Danell E. (2002). Physiological and genetic characterization of fluorescent *Pseudomonas* associated with *Cantharellus cibarius*. *Canadian journal of microbiology*, 48(8), 739-748.
- RAS – Regione Autonoma della Sardegna.** (2007). Piano Forestale Ambientale Regionale. Relazione generale e allegati. [www.regione.sardegna.it](http://www.regione.sardegna.it)
- Reiter B.**, Sessitsch A. (2006). Bacterial endophytes of the wildflower *Crocus albiflorus* analyzed by characterization of isolates and by a cultivation-independent approach. *Canadian journal of microbiology*, 52(2), 140-149.
- Rivera C.S.**, Blanco D., Oria R., Venturini M.E. (2010). Diversity of culturable microorganisms and occurrence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in *Tuber aestivum* and *Tuber melanosporum* ascocarps. *Food microbiology*, 27(2), 286-293

- Rodríguez H.**, Fraga R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4), 319-339.
- Rodríguez H.**, Fraga R., Gonzalez T., Bashan T. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and soil*, 287(1), 15-21.
- Roesch L.F.**, Fulthorpe R.R., Riva A., Casella G., Hadwin A.K., Kent A.D., *et al.* (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME journal*, 1(4), 283-290.
- Rölleke S.**, Witte A., Wanner G., Lubitz W. (1998). Medieval wall paintings—a habitat for archaea: identification of archaea by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA in a medieval wall painting. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41(1), 85-92.
- Rossi S.**, Montecchio L. (2005). L'ectomicorizzazione artificiale nella vivaistica forestale. *Sherwood*, 107, 35-38.
- Rousseau J.V.D.**, Sylvia D.M., Fox A.J. (1994). Rousseau, J. V. D., Sylvia, D. M., & Fox, A. J. (1994). Contribution of ectomycorrhiza to the potential nutrient-absorbing surface of pine. *New Phytologist*, 128(4), 639-644.
- Santiago-Mora R.**, Martin-Laurent F., de Prado R., Franco A.R. (2005). Degradation of simazine by microorganisms isolated from soils of Spanish olive fields. *Pest management science*, 61(9), 917-921.
- Saravanakumar D.**, Samiyappan, R. (2007). ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *Journal of Applied Microbiology*, 102(5), 1283-1292.
- Satola B.**, Wübbeler J.H., Steinbüchel A. (2013). Metabolic characteristics of the species *Variovorax paradoxus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(2), 541-560.
- Sbrana C.**, Agnolucci M., Bedini S., Lepera A., Toffanin A., Giovannetti M., Nuti M.P. (2002). Diversity of culturable bacterial populations associated to *Tuber borchii* ectomycorrhizas and their activity on *T. borchii* mycelial growth. *FEMS Microbiology Letters*, 211(2), 195-201.
- Sbrana C.**, Nuti M. P., Giovannetti M. (2007). Self-anastomosing ability and vegetative incompatibility of *Tuber borchii* isolates. *Mycorrhiza*, 17(8), 667-675.

- Schaad N.W.**, Postnikova E., Sechler A., Claflin L.E., Vidaver A.K., Jones, J.B., *et al.* (2008). Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. Avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. *Systematic and applied microbiology*, 31(6), 434-446.
- Schippers B.**, Bakker A.W., Baker P.A.H.M. (1987) Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual review of Phytopathology*, 25(1), 339-358.
- Schüßler A.**, Schwarzott D., Walker C. (2001). A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105(12), 1413-1421.
- Séguin A.**, Lalonde M. (1989). Detection of pectolytic activity and pel homologous sequences in Frankia. *Plant and Soil*, 118(1), 221-229.
- Selosse M.A.**, Le Tacon F. (1998). The land flora: a phototroph-fungus partnership?. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(1), 15-20.
- Sessitsch A.**, Reiter B., Berg G. (2004). Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Canadian journal of microbiology*, 50(4), 239-249.
- Sequi P.**, De Nobili M., Leita L., Cercignani G. (1986). A new index of humification. *Agrochimica*, 30(1-2), 175-179.
- Simard S.W.**, Perry D.A., Jones M.D., Myrold D.D., Durall D.M., Molina R. (1997). Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature*, 388(6642), 579-582.
- Smith D.**, Alvey S., Crowley D.E. (2005). Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 53(2), 265-273.
- Smith S.E.**, Read D.J. (2008). Mycorrhizal symbiosis, 3rd edn. Cambridge, UK: Academic Press.
- Soler-Rivas C.**, Jolivet S., Arpin N., Olivier J. M., Wichers H. J. (1999). Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *FEMS microbiology reviews*, 23(5), 591-614.

- Splivallo R.**, Maier, C. (2010). *U.S. Patent No. 20120100255A1*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Splivallo R.**, Ottonello S., Mello A., Karlovsky P. (2011). Truffle volatiles: from chemical ecology to aroma biosynthesis. *New Phytologist*, 189(3), 688-699.
- Splivallo R.**, Deveau A., Valdez N., Kirchhoff N., Frey-Klett P., Karlovsky P. (2015a). Bacteria associated with truffle-fruited bodies contribute to truffle aroma. *Environmental microbiology*, 17(8), 2647-2660.
- Splivallo R.**, Ebeler S.E. (2015b). Sulfur volatiles of microbial origin are key contributors to human-sensed truffle aroma. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(6), 2583-2592.
- Stover C.K.**, Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warrenner P., Hickey M.J. et al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959-964.
- Sturz A.V.**, Peters R.D., Carter M.R., Sanderson J.B., Matheson B.G., Christie, B.R. (2005). Variation in antibiosis ability, against potato pathogens, of bacterial communities recovered from the endo-and exoroots of potato crops produced under conventional versus minimum tillage systems. *Canadian journal of microbiology*, 51(8), 643-654.
- Surette M.A.**, Sturz A.V., Lada R.R., Nowak J. (2003). Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant and soil*, 253(2), 381-390.
- Tien T.M.**, Diem H.G., Gaskins M.H., Hubbell D.H. (1981). Polygalacturonic acid transeliminase production by *Azospirillum species*. *Can J Microbiol*, 27:426–431
- Torsvik V.L.**, and Goksøyr J. (1978). Determination of bacterial DNA in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 10(1), 7-12.
- Torsvik V.**, Goksøyr J., Daae, F.L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 56(3), 782-787.
- Torsvik V.**, Sørheim R., Goksøyr J. (1996). Total bacterial diversity in soil and sediment communities—a review. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 17(3), 170-178.
- Trappe, J.M.** (1979). The orders, families, and genera of hypogeous Ascomycotina (truffles and their relatives)[*Clelandia arenacea*, *Dingleya verrucosa*, *Choiromyces aboriginum*, *Peziza stuntzii*, new taxa, Fungi]. *Mycotaxon (USA)*

- Umali-Garcia M.**, Hubbell D.H., Gaskins M.H., Dazzo F.B. (1980). Association of *Azospirillum* with grass roots. *Appl Environ Microbiol*, 39(1):219–226
- Van Houdt R.**, Moons, P., Jansen A., Vanoirbeek K., Michiels, C.W. (2005). Genotypic and phenotypic characterization of a biofilm-forming *Serratia plymuthica* isolate from a raw vegetable processing line. *FEMS microbiology letters*, 246(2), 265-272.
- Vilà M.**, Sardans J. (1999). Plant competition in Mediterranean-type vegetation. *Journal of Vegetation Science*, 10(2), 281-294.
- Violante P.** (2000). Metodi di analisi chimica del suolo. Franco Angeli. Milano.
- Vivas A.**, Barea J.M., Azcón R. (2005). *Brevibacillus brevis* isolated from cadmium-or zinc-contaminated soils improves in vitro spore germination and growth of *Glomus mosseae* under high Cd or Zn concentrations. *Microbial ecology*, 49(3), 416-424.
- Walkley A.**, Black I.A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil science*, 37(1), 29-38.
- Wang Y.P.**, Gu J.D. (2006). Degradability of dimethyl terephthalate by *Variovorax paradoxus* T4 and *Sphingomonas yanoikuyae* DOS01 isolated from deep-ocean sediments. *Ecotoxicology*, 15(6), 549-557.
- Warmink J.A.**, Nazir R., Van Elsas J.D. (2009). Universal and species-specific bacterial ‘fungiphiles’ in the mycospheres of different basidiomycetous fungi. *Environmental Microbiology*, 11(2), 300-312.
- Wechter W.P.**, Begum D., Presting G., Kim J.J., Wing R.A., Kluepfel D.A. (2002). Physical mapping, BAC-end sequence analysis, and marker tagging of the soilborne nematocidal bacterium, *Pseudomonas synxantha* BG33R. *Omics: a journal of integrative biology*, 6(1), 11-21.
- Whitman W.B.**, Coleman D.C., Wiebe W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578-6583.
- Willems A.**, Falsen E., Pot B., Jantzen E., Hoste B., Vandamme P., De Ley J. (1990). *Acidovorax*, a new genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, E. Falsen (EF) group 13, EF group 16, and several clinical isolates, with the species *Acidovorax facilis* comb. nov., *Acidovorax delafieldii* comb. nov., and *Acidovorax temperans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 40(4), 384-398.

- Willems A.**, De Ley J., Gillis M., Kersters K. (1991). *Comamonadaceae*, a new family encompassing the acidovorans rRNA complex, including *Variovorax paradoxus* gen. nov., comb. nov., for *Alcaligenes paradoxus* (Davis 1969). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(3), 445-450.
- Winogradsky S.** (1949). *Microbiologie du sol: problèmes et méthodes* (p. 861). Paris: Masson
- Young R.F.**, Cheng S.M., Fedorak P.M. (2006). Aerobic biodegradation of 2, 2'-dithiodibenzoic acid produced from dibenzothiophene metabolites. *Applied and environmental microbiology*, 72(1), 491-496.
- Zaidi S.**, Usmani S., Singh B.R., Musarrat J. (2008). Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere*, 64(6), 991-997.
- Zambonelli A.**, Branzanti, M.B. (1990). Mycorrhizal synthesis of *Tuber albidum* Pico with *Castanea sativa* Mill., *Quercus suber* L. and *Alnus cordata* Loisel. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 28(1-4), 563-567.
- Zak J.C.**, Willig M. R., Moorhead D., Wildman H.G. (1994). Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(9), 1101-1108.
- Zhao X.**, Chen S.X., Xie Z.X., Shen P. (2006). Isolation, identification and over-siderophores production of *Pseudomonas fluorescens* sp-f. *Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica*, 46(5), 691-695.
- Zhao L.**, Wu X.Q., Ye J.R., *et al.* (2014). Isolation and characterization of a mycorrhiza helper bacterium from rhizosphere soils of poplar stands. *Biology and fertility of soils*, 50(4), 593-601.
- Zhuang X.L.**, Chen J., Shim H., Bai Z. (2007). New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment international*, 33(3), 406-413.